creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000236053

2008년 2월
석사학위 논문

마타리(*Patrinia scabiosaefolia* F.)로부터 새로운 Iridoid계 화합물 분리 및 구조 규명

조 선 대 학 교 대 학 원

생물신소재학과

최 은 진

마타리(*Patrinia scabiosaefolia* F.)로부터 새로운 Iridoid계 화합물 분리 및 구조규명

Isolation and Structure determination of New iridoids from *Patrinia scabiosaefolia* F.

조 선 대 학 교 대 학 원

생물신소재학과

최 은 진

2008년 2월

석사학위 논문

마타리(*Patrinia scabiosaefolia* F.)로부터 새로운 Iridoid계 화합물 분리 및 구조규명

지 도 교 수 우 은 란

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2007년 11월

조 선 대 학 교 대 학 원

생물신소재학과

최 은 진

최은진의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 함 경 수 (인)

위 원 조선대학교 교수 전 홍 성 (인)

위 원 조선대학교 교수 우 은 란 (인)

2007년 11월

조 선 대 학 교 대 학 원

Contents

Contents ····· I

List of Schemes ····· III

List of Tables ····· IV

List of Figures ····· V

Abstract ····· VI

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 실 험 ····· 3

1. 실험재료 ····· 3

2. 시약 및 기기 ····· 3

2-1. 시약 ····· 3

2-2. 기기 ····· 4

3. Compound의 분리 ····· 5

3-1. 추출 및 분획 ····· 5

3-2. CH_2Cl_2 분획으로부터 compound의 분리 ····· 6

3-2-1. Compound 1의 분리 ····· 6

3-2-2. Compound 2의 분리 ····· 7

3-2-3. Compound 3의 분리 ····· 7

3-2-4. Compound 4의 분리 ····· 8

3-2-5. Compound 5의 분리 ····· 9

4. 생리활성 ····· 13

4-1. NBT superoxide scavenging assay ·····13
4-2. Cytotoxic activity assay ·····13
4-3. MG-63에서 hIL-6의 유리 확인 ·····14

Ⅲ. 결과 및 고찰 ·····18
1. Compound 1의 구조 ·····18
2. Compound 2의 구조 ·····19
3. Compound 3의 구조 ·····20
4. Compound 4의 구조 ·····20
5. Compound 5의 구조 ·····21
6. 생리활성 결과 ·····22
6-1. NBT superoxide scavenging assay ·····22
6-2. Cytotoxic activity assay ·····22
6-3. MG-63에서 hIL-6의 유리 확인 ·····22
Ⅳ. 결 론 ·····23
Ⅴ. 참 고 문 헌 ·····24
APPENDIX ·····25

List of Schemes

Scheme Ⅰ. Extraction and fractionation of MeOH extract from *Patrinia scabiosaefolia* F. ·····5

Scheme Ⅱ. Fractionation of the CH_2Cl_2 extract from *Patrinia scabiosaefolia* F. ·····6

Scheme Ⅲ. Isolation of compounds 1-5 from CH_2Cl_2 extract of *Patrinia scabiosaefolia* F. ·····9

List of Figures

Fig. 1-1. Structures of compounds 1-1 isolated from *patrinia scabiosarfolia* F. ·····10

Fig. 1-2. Structures of compounds 1-2 isolated from *patrinia scabiosarfolia* F. ·····12

Fig. 2. Selected ^{1}H-^{13}C long-range correlations in HMBC spectrum of compound 1~3 ·····28

Fig. 3. ^{1}H-NMR spectrum of compound 1 (500 ㎒, $CDCl_3$) compound 1 ·····28

Fig. 4. ^{13}C-NMR spectrum of compound 1 (125 ㎒, $CDCl_3$) compound 1 ·····29

Fig. 5. H - H COSY spectrum of compound 1 compound 1 ·····30

Fig. 6. NOESY spectrum of compound 1 compound 1 ·····31

Fig. 7. HR-FAB-Mass spectrum of compound 1 compound 1 ·····32

Fig. 8. ^{1}H-NMR spectrum of compound 2 (500 ㎒, $CDCl_3$) compound 2 ·····33

Fig. 9. ^{13}C-NMR spectrum of compound 2 (125 ㎒, $CDCl_3$) compound 2 ·····34

Fig. 10. H - H COSY spectrum of compound 2 compound 2 ·····35

Fig. 11. NOESY spectrum of compound 2 compound 2 ·····34

Fig. 12. HR-FAB-Mass spectrum of compound 2 compound 2 ·····36

Fig. 13. ^{1}H-NMR spectrum of compound 3 (500 ㎒, $CDCl_3$) ·····37
Fig. 14. ^{3}C-NMR spectrum of compound 3 (125 ㎒, $CDCl_3$) ·····38
Fig. 15. ^{1}H-NMR spectrum of compound 3 (500 ㎒, $CDCl_3$) ·····39
Fig. 16. ^{3}C-NMR spectrum of compound 3 (125 ㎒, $CDCl_3$) ·····40
Fig. 17. H - H COSY spectrum of compound 3 ·····40
Fig. 18. NOESY spectrum of compound 3 ·····42
Fig. 19. HR-EI-Mass spectrum of compound 3 ·····43
Fig. 20. ^{1}H-NMR spectrum of compound 4 (500 ㎒, $CDCl_3$) ·····44
Fig. 21. ^{13}C-NMR spectrum of compound 4 (125 ㎒, $CDCl_3$) ·····45
Fig. 22. ^{1}H-NMR spectrum of compound 5 (500 ㎒, $CDCl_3$) ·····47
Fig. 23. ^{13}C-NMR spectrum of compound 5 (125 ㎒, $CDCl_3$) ·····48

Abstract

Isolation and Structure determination of New iridoids from *Patrinia scabiosaefolia* F.

Choi - Eun Jin
Advisor : Prof. Woo, Eun-Rhan, Ph.D.
Department of Bio materials,
Graduate School of Chosun University.

*P*atrinia scabiosaefolia (Valerianaceae) is a perennial herb and an endemic species in Korea. The genus Patrinia is taxonomically classified into four species, P. saniculaefolia,P. scabiosaefolia, P. villosa, and P. rupestris.[3] This genus is one of the valuable crude drugs which has been used in Korea and China as a traditional folk medicine for the treatment of initial stages of edema, appendicitis, endometriosis and inflammation.[4] Saponins, coumarins, iridoids,and flavonoids isolated from this genus have demonstrated sedative, antibacterial, and cytotoxic effects, In an ongoing investigation into anti-proinflammatory compounds from natural products, the methylene chloride soluble fraction of *P. scabiosaefolia* F was found to inhibit hIL-6 production in TNF-α stimulated human osteoblast-like MG-63cell line. Bioassay-guided isolation of this fraction led to the purification of three-new iridoid compounds, and two-lignan compounds. Three new iridoid gave a name to PatiridoidⅢ(1), PatridoidⅣ(2), PatridoidⅤ(3). compound1 has two-isovaleryoxy group and C-8 has methoxyl group

and C-10 has oxygen-bearing methylene also compound2 has two-isovaleryoxy group and C-10 has oxygen-bearing methyene group. compound3 have three methoxyl group that located C-1, C-3, C-11. For that this reason they are considered as new compounds. Compound4, Sesquilignan of Lappaol E, already isolated from *Arctium*, this compound have three aromatic rings, carbonyl carbone, and oxymethin-carbone. Compound5, Dibenzylbutyrolactone lignan - Nortrachelogenin. This compoumd has been isolated another plant. their structure were determined by ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, HMBC, HSQC and NOESY. all of there compounds pure form. In vitro anti-inflammatory activity was evaluated by inhibition(%) of hIL-6 production in TNF-α stimulated MG-63 cell line. Compound 5, isolated from the CH_2Cl_2 fraction decreased to 66.1± 2.5%.

Ⅰ. 서론

마타리(Patrinia scabiosaefolia F.)는 쌍떡잎식물 합판화군 꼭두서니 목 마타리 과의 여러해살이풀로서 개화기는 7월~8월 우리나라, 일본, 타이완, 중국, 시베리아, 동부 등지에 분포하며 산이나 들에서 자란다. 전초의 높이는 60~150㎝ 이며, 잎은 대생 하고 우상으로 깊이 갈라지며 양면에 복모가 있고, 밑 부분의 것은 엽병이 있고 위로 갈수록 없어진다. 근 새 엽 난형 내지 긴 타원형이다. 꽃은 7-8월에 피며 황색이고 가지 끝과 원줄기 끝에 산 방상으로 달리며 화서분지의 한쪽에 돌기 같은 흰털이 있다. 화관은 황색이고 지름 3-4mm로서 5개로 갈라지며 통부가 짧고, 4개의 수술과 1개의 암술이 있으며, 자방은 하위이고 3실로서 그 중 1실만이 종자를 맺는다. 열매는 수과로 타원형이며 길이는 3-4mm로서 약간 편평하고 앞면에는 맥이 있으며 뒷면에는 능선이 있다. 줄기의 높이 60-150cm이고 곧게 자라며 줄기 윗부분에서 분지하고 털이 없으나 밑 부분에는 털이 약간 있으며 밑에서 새싹이 갈라져서 번식한다. 근경은 굵고 옆으로 뻗는다. 굵은 뿌리가 비스듬히 뻗으며, 몇 개의 잔뿌리가 내린다. (1~2)

마타리(패장) 이라는 이름은 마타리의 콩으로 만든 장이 오래되어 썩은 냄새가 나기 때문에 생긴 이름이다. 또한 어린 싹을 채취하여 쪄서 나물로 먹는데 맛이 약간 쓰고 오래된 장 냄새가 나기 때문에 고채라고 불렀다. 마타리는 특이한 냄새가 있으며 맛은 맵고 쓰며 성질은 약간 차다. 마타리(패장)는 혈의 순환이 되지 않고 외부 충격으로 어혈이 질 때 사용하며 종기, 맹장염, 폐 농양으로 인한 해수, 농혈이 있을 때, 어혈로 인한 동통, 산후 어혈복통에도 쓴다. 성분은 전초의 경우 정유(Oil)가 함유되어 있고 건조된 과지에는 sinigrin이 함유되어 있다. 뿌리와 근경에는 morroniside, loganin, villoside, oleanolicacid, hederagenin, β-sitosterol-β-D-glucoside와 다종의 saponin을 함유한다. 특히 뿌리에는 정유(Oil) 8%, alkaloid, tannin, 전분 등이 함유되어 있고 정유에는 15종 이상의 성분이 함유되어 있는데 주요한 것은 진정과 최면작용의 유효성분인 patrinene과 isopatrinene이 함유 되어 있는 것으로 알려졌다.(3~14) 이러한 약리작용에 근거하여 마타리의 MeOH, CH2Cl2, EtOAc, n-BuOH 및 H2O 분획으로 NBT assay를 통한 항산화활성, SRB 방법을 이용한 세포독성, 그리고 TNF-α에 의해 유도된 MG-63 세포주의 hIL-6 유리 저해활성을 검색하였다. 그 결과 마타리의 CH_2Cl_2 분획이 위

여러 가지 활성을 가진 것으로 나타났고, 이를 바탕으로 마타리의 CH_2Cl_2 분획으로부터 화합물 분리를 실행하였다.

마타리 (***Patrinia scabiosaefolia*** **F.**) CH_2Cl_2 분획에서 새로운 3개의 iridoid와 2개의 butyrolactonesesquilignan을 분리 하였다. 성분 분리는 open column chromatography를 통하여 이루어졌고, 분광학적 분석 (NMR)에 의하여 구조가 분석 되었다. 새롭게 분리된 iridoid 중 compound 1,2 는 C-8 위치에 methoxyl group과 hydroxy group이 각각 존재함으로써 신규화합물로 인정되며, compound 3 는 C-1, C-3, C-11 위치에 각각 methoxyl group이 존재함으로써 인정되며, 새롭게 분리된 compound 1, compound 2, compound 3을 각각 Patridoid Ⅲ, Patridoid Ⅳ, Patridoid Ⅴ라 명명 하였다. Compound 4, 5 는 이미 ***Arctium Lappa*** **L.** 분리 구조 규명 되었다. Compound 4는 butyrolactonesesquilignan type 중 Lappoal E 이며, Compound 5 역시 butyrolactonesesquilignan type 중 Nortrachelogen 이었다.

분리한 화합물을 세포 독성이 없는 농도에서 TNF-α에 의해 유도된 hIL-6의 억제작용을 알아보기 위하여 MG-63 세포주을 이용한 hIL-6의 유리 억제 실험을 실시하였다. 여기서 hIL (human interleukin)-6은 cytokine 일종의 단백질 그룹으로 일부는 림프구 계통의 세포가 성장하여 면역조정 역할을 하며 조혈작용을 조절한다. 대부분의 cytokine은 표적세포의 세포표면 수용기로 통하여 작용하며 호르몬과 유사하다. 항 세포증식작용, 항 미생물작용, 항종양작용의 기능을 하기 때문에 감염, 염증, 자가 면역질환, 종양치료제로 사용되고 있다. 이러한 여러 기능을 가진 hIL-6의 생산 조절이 잘못되면 류마티스 관절염, 간 경변, 건선 피부병, 다발성 골수종, 심장 점액종, 후천성 면역 결핍증 등의 여러 가지 자가 면역질환을 유발하는 것으로 알려져 있다. 한편 다발성 골수종, 류마티스 관절염, 조기 분만 및 조기 양 막 파열 산모의 경우, 여러 조직에서 hIL-6의 높은 수준으로 검출되는 것으로 보고되었다. 또한 염증성 신경 관절 질환(관절염, 신경통, 근육통)에 관한 많은 연구가 보고되어졌다.[15~17]

Compound 4, 5 이용하여 hIL-6의 유리 저해 활성을 알아 본 결과 compound 4, 5에 대한 각각의 hIL-6의 유리정도는 66.1±2.5 %, 18.7±8.3 % 이었다. 그 결과 compound 5는 MG-63 세포주로부터 hIL-6의 유리가 현저히 감소하는 것을 볼 수 있었다. 그래서 이에 관한 전반적인 실험 내용을 보고 하고자 한다.

Ⅱ. 실험

1. 실험재료

실험에 이용된 마타리(***Patrinia scabiosaefolia* F.**)는 2003년 7月 조선대학교 약학대학 약초원에서 채취하여 전문가의 동정 과정을 거쳐 사용하였으며, 표본은 조선대학교 약학대학 표본실에 보관 중이다.

2. 시약 및 기기

2-1. 시약

① 용매

추출 및 분획용 시약은 1급 시약을 사용하였으며, TLC와 chromatography용 시약은 1급 또는 특급 시약을 사용하였다.

② Packing materials

Column chromatography의 packing material로는 Kieselgel 60(63-200 ㎛, Art. 7734, Merck)와 Kieselgel 60(40-63 ㎛, Art. 9385, Merck), Lipophlic Sephadex LH-20(25-100 ㎛, Lot 81K1092, Sigma), LiChroprep RP-18(40-63 ㎛, L610400 138, Merck), MCI gel CHP20P(75-150㎛, Mitsubishi Chemical Corporation) 등을 사용하였다.

③ TLC

Thin layer chromatography용 plate는 pre-coated silica gel 60 F254 plate(layer thickness 0.25㎜, 20×20 ㎝. Art. 5715, Merck)와 pre-coated RP-18 F254s plate(layer thickness 0.25 ㎜, 20×20 ㎝. Art. 5423, Merck)를 사용하였다. pre-partive thin layer chromatography (PTLC)용은 plate는 pre-coated silica gel 60 F254 plate(layer thickness 0.5 ㎜, 20×20 ㎝. Art. 5744, Merck)와 pre-coated RP-18 F254s plate(layer thickness 1 ㎜, 20×20 ㎝. Art. 5434, Merck)를 사용하였다.

2-2. 기기

실험에 사용한 기기는 다음과 같다.

IR : JASCO FT/IR-300E (Jasco Co., Japan)

UV : JASCO V-550 (Jasco Co., Japan)

FAB-MS : JMS 700(JEOL)

^{1}H-NMR : Varian Unity Inova 500 ㎒ and 300 ㎒

^{13}C-NMR : Varian Unity Inova 500 ㎒ and 300 ㎒

Polarimeter : AUTOPOL®IV automatic polarometer
(Rudolph Research Flangers, NJ 07836)

HPLC pump : Waters 1525 Binary HPLC pump

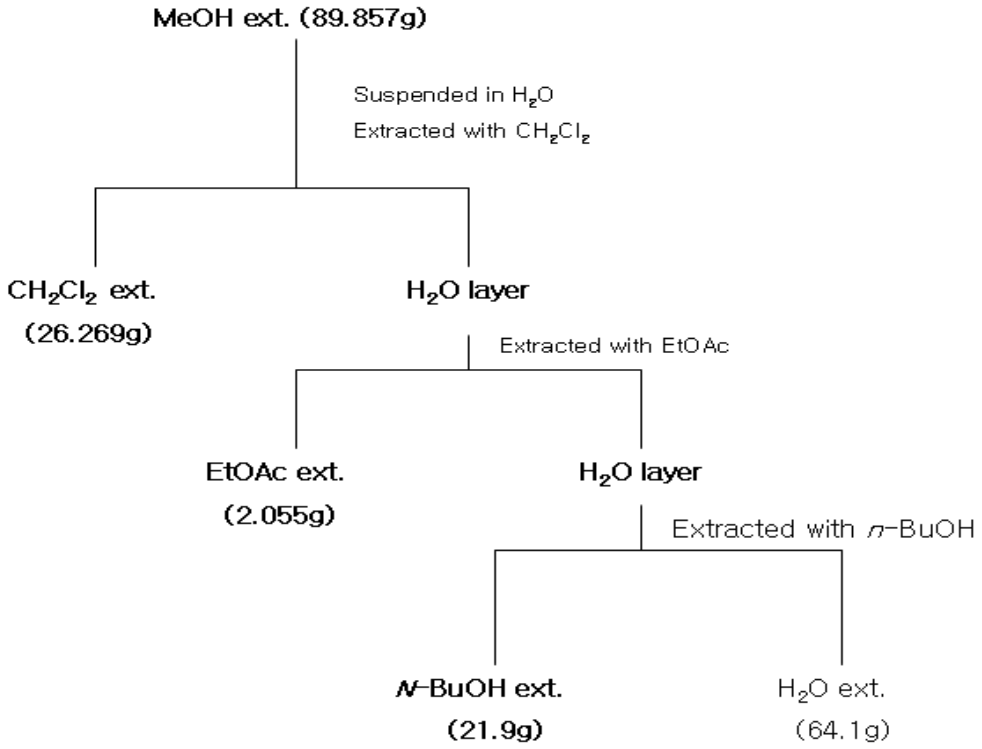
HPLC UV Detector : Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector

GC/Mass System : Hewlett-Packard 5985

3. 화합물의 분리

3-1. 추출 및 분획

마타리 (***Patrinia scabiosaefolia*** **F.**) 1 ㎏을 MeOH 9ℓ로 80℃에서 3시간 동안 3회에 걸쳐 진탕하면서 추출한 후 여과, 감압 농축하여 151.161 g의 MeOH extract를 얻었다. 이를 증류수로 현탁 하고 methylene chloride (CH_2Cl_2), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH) 순서로 분획하였다. (Scheme Ⅰ).

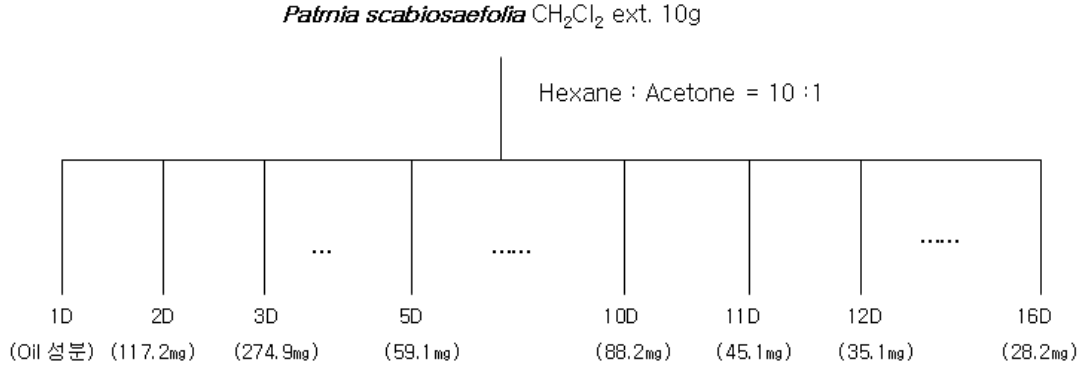


Scheme Ⅰ. Extraction and fractionation of the MeOH extract from *Patrina scabiosaefolia* F.

3-2. CH_2Cl_2 분획으로부터 compound의 분리

마타리의 MeOH, CH_2Cl_2, EtOAc, *n*-BuOH, H_2O 분획에 대한 항산화 활성 (anti-oxidative activity), 세포 독성 측정 (cytotoxic activity assay), hIL-6 유리저해를 검색하였고, 세포 독성이 없는 농도의 CH_2Cl_2 분획에서 항산화 활성 및 TNF-a에 의해 증가된 hIL-6의 유리가 저해되었다. 이를 바탕으로 마타리의 CH_2Cl_2 분획으로부터 위의 생리 활성을 가진 물질을 분리하고자 본 실험을 시작하였다.

마타리의 CH_2Cl_2 ext.(10 g) *n*-Hexane : Acetone solvent system을 이용하여 Silica gel60 (63-200 mesh)을 이용 open column chromatography를 실시하여 모두 16개의 소 분획을 얻었다.(Scheme II).



Scheme II. Fractionation of the CH_2Cl_2 extract from *Patrinia scabiosaefolia* F.

3-2-1. Compound 1의 분리

Subfraction 5D(64.9 mg)를 Chloroform : MeOH (100 : 1 → 10:1) 용매조건으로 Silica gel 60 (40-63 mesh)을 이용하여 open column chromatography를 실시하였다. 각각의 silica gel 60 F254, RP-18 F254 TLC pattern으로 확인하여 분리된 정도에 따라 3개의 분획으로 나누었다.

이 분획들 중 5D-3P(10 mg)분획을 MeOH : H_2O (2:1)의 용매조건으로 Lichroprep RP-18을 이용한 column chromatography를 실시하여 compound 1 (2.4 mg)을 얻었다. Compound 1은 UV 단파장(245㎚)에서 흡수를 보이며, 장파장(365㎚)에서는 흡수를 보이지 않았다. 10% 황산용액으로 발색 하였을 경

우 짙은 갈색으로 나타났다.
Compound1 : ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR data (Table1,2)
Yellowish Oil
Molecular formula : $C_{22}H_{34}O_8$
HR-EI-MS : m/z 427.3794 $[M+Na]^+$
$[\alpha]_D^{25}$: - 5.955°(c = 1.0 , MeOH)
IR V_{max} (KBr)cm-1 : 3450, 1740, 1290, 1100

^{1}H-NMR (500MHz, CD_3OD) δ ppm :
6.2 (1H, d, J=7.0 Hz, H-1), 5.2 (1H, s, H-3), 6.8 (1H, d, J=5.5 Hz, H-6), 6.3 (1H, d, J=6.0 Hz, H-7), 2.9 (1H, d, J=6.5 Hz, H-9), 3.9 (1H, s, H-10), 3.7 (1H, d, J=11.0 Hz, H-10), 4.6 (1H, d, J=4.6 Hz, H-11), 4.8 (1H, d, J=4.8 Hz, H-11), 2.2 (2H, s, H-2'), 2.1 (1H, s, H-3'), 0.9 (6H, dd, J=6.5 Hz, H-4',H-5'), 2.2 (2H, s, H-2"), 2.2 (1H, s, H-3"), 0.8 (6H, dd, J=6.5 Hz, H-4", H-5"), 3.4 (OCH_3, H-3),3.0 (OCH_3, H-8)
^{13}C-NMR (125MHz, CD_3OD) δppm :
90.4 (C-1), 98.4 (C-3), 124.3 (C-4), 143.0 (C-5), 132.5 (C-6), 138.8 (C-7), 87.6(C-8), 45.4 (C-9), 67.2 (C-10), 60.0 (C-11), 171.9 (C-1'), 43.2 (C-2'), 25.5(C-3'), 22.3 (C-4'), 22.3 (C-5'), 172.8 (C-1"), 43.5 (C-2"), 25.6 (C-3"), 22.4 (C-4"), 22.4 (C-5"), 55.9 (OCH_3 , C-3), 55.4 (OCH_3, C-8)

3-2-2. Compound 2의 분리

Subfraction 5D(59.1 mg)를 Chloroform : MeOH (100 : 1 → 10:1) 용매조건으로 Silica gel 60 (40-63 mesh)을 이용하여 open column chromatography를 실시하였다. 각각의 silica gel 60 F254, RP-18 F254 TLC pattern으로 확인하여 분리된 정도에 따라 3개의 분획으로 나누었다.

이 분획들 중 5D-2P(10 mg)를 MeOH : H_2O (2:1)를 용매조건으로 하여 MCI gel CHP20P(75-150μ, Mitsubishi chemical Corpolation)를 이용한 Column chromatography를 실시하여 compound 2 (2.0 mg)를 얻었다. 이 화합물은 UV 단파장 (245㎚)에서는 흡수를 보이며 장파장 (365㎚)에서는 흡수를 보이지 않았다. 10% 황산용액으로 발색 시 갈색으로 나타났다.
Compound 2 : ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR data (Table1,2)

Yellowish oil
Molecular formula : $C_{21}H_{32}O_7$
HR-EI-MS : *m/z* 381.1913 [M, $-CH_3]^+$
$[\alpha]_D^{25}$: 51.970 (c= 0.075, MeOH)
IR V_{max} *(KBr)cm-1* : 3450, 1740, 1290, 1100

^{1}H-NMR (500MHz, CD_3OD) δ ppm :
6.2 (1H, d, J=7.5 Hz, H-1), 5.2 (1H, s, H-3), 6.7 (1H, d, J=5.5 Hz, H-6), 6.3 (1H, d, J=5.5 Hz, H-7), 2.8 (1H, d, J= 7.5 Hz, H-9), 3.5 (1H, d, J=11Hz, H-10), 3.7 (1H, d, J=11 Hz, H-10), 4.6 (1H, d, J= 11 Hz, H-11), 4.8 (1H, d, J=12.5Hz, H-11), 2.1 (2H, s, H-2'), 0.9 (6H, dd, H-4',5'), 2.2 (2H, s, H-2"), 0.94 (3H, s, H-4"), 0.95 (3H, s, H-5"), 3.4 ($OC\underline{H}_3$)
^{13}C-NMR (125MHz, CD_3OD) δ ppm :
91.6 (C-1), 98.8 (C-3), 143.0 (C-4), 125.4 (C-5), 130.3 (C-6), 141.4 (C-7), 83.1(C-8), 46.0 (C-9), 68.0 (C-10), 60.1 (C-11), 172.2 (C-1'), 43.5 (C-2'), 25.5 (C-3'), 22.3 (C-4',5'), 172.8 (C-1"), 43.2 (C-2"), 25.6 (C-3"), 22.4 (C-4",5"), 55.8 ($O\underline{C}H_3$)

3-2-3 Compound 3의 분리
Subfraction 9D(109.1 mg)를 Chloroform : MeOH (100 : 1 → 10:1) 을 용매조건으로 하여 Silica gel 을 이용한 Column chromatography를 실시하고, MeOH : H_2O (2:1)를 전개용매로 Lichroprep RP-18로 정제하여 Compound 3 (2.3 mg)을 얻었다. 이 화합물은 UV 단파장에서 흡수가 강하게 있으며, 10% 황산용액에서 짙은 갈색으로 발색된다.
Compound 3 : ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR data (Table1,2)
Yellowish Oil
Molecular formula : $C_{13}H_{18}O_6$
HR-EI-MS : m/z 271.1182 $[M+H]^+$
$[\alpha]_D^{25}$: + 3.208°(C= 1.05, MeOH)
IR V_{max} *(KBr)cm-1* : 3450, 1668, 1290,1100

^{1}H-NMR (500MHz, CD_3OD) δ ppm :

5.8 (1H, s, H-1), 5.2 (1H, s, H-3), 3.0 (2H, d, J= 8.0Hz), 4.4 (2H, d, J= 2.5Hz), 4.0 (1H, d, J=13.0 Hz, H-11), 4.1 (1H, d, J=12.5 Hz, H-11), 3.6 ($OC\underline{H}_3$), 3.5 ($OC\underline{H}_3$), 3.3 ($OC\underline{H}_3$)

^{13}C-NMR (125MHz, CD_3OD) δ ppm :

93.4 (C-1), 96.5 (C-3), 132.0 (C-4),130.2 (C-5), 36.0 (C-6), 203.4 (C-7), 140 (C-8), 155.8 (C-9), 55.4 (C-10), 69.4 (C-11), 56.2 ($O\underline{C}H_3$), 56.4 ($O\underline{C}H_3$), 55.9 ($O\underline{C}H_3$)

3-2-4 Compound 4의 분리

Subfraction 14D(172.2 mg)를 Hexane : Acetone (5 : 1 → 3 : 1) 을 용매조건으로 하여 Silica gel 을 이용한 Column chromatography를 실시하고, MeOH : H_2O (2:1)를 전개 용매로 Lichroprep RP-18로 정제하여 Compound 4를 얻었다. 이 화합물은 UV 흡수가 강하게 나타났으며, 10% 황산용액에서 옅은 붉은빛으로 발색된 후 노란색으로 변화하였다.

Compound 4 : ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR data (Table1,2)

Yellowish oil

Molecular formula : $C_{34}H_{30}O_{10}$

EI-MS : *m/z* 536(M+ , - H_2O)

$[\alpha]_D^{20}$: - 26.56 ° (C = 1.0 , $CHCl_3$)

IR V_{max} *(KBr)cm-1* : 3430, 1760, 1600, 850, 810

^{1}H-NMR (500MHz, CD_3OD) δ ppm :

6.60 (1H, d, J= 2.0Hz, H-2), 6.61 (1H, s, H-5), 6.59 (1H, d, J= 2.0 Hz, H-6), 2.88 (1H, dd, J= 7.0, 14.0Hz, H-7), 2.93 (1H, dd, J= 7.0, 14.0Hz, H-7), 2.56 (1H, dd, J= 2.0, 7.5Hz, H-7'), 2.59 (1H, dd, J= 5.5, 14.5Hz, H-7'), 2.44 (1H, dd, J= 7.5, 14.5 Hz, H-8), 2.53 (1H, dd, J= 2.0, 7.5Hz, H-8'), 3.87 (1H, d, J= 3.5Hz, H-9'), 4.13 (1H, dd, J= 7.5, 9.0Hz, H-9'), 6.87 (1H, d, J= 7.5Hz, H-2'), 6.40 (1H, d, J= 1.5 Hz, H-5'), 6.49 (1H, dd, J= 1.5, 6.5Hz, H-6'), 3.0 (1H, dd, J= 4.5, 6.5 Hz, H-10), 4.7 (1H, J= 4.5 Hz, H-11), 3.88 (1H, d, J= 2.0Hz, H-12), 4.23 (1H, dd, J= 7.0, 9.5 Hz, H-12), 6.89 (1H, d, J = 2.0Hz, H-2"), 6.82 (1H, d, J=2.0Hz, H-4"), 6.88 (1H, s, H-6), 3.810 ($OC\underline{H}_3$), 3.817 ($OC\underline{H}_3$), 3.90 ($OC\underline{H}_3$)

^{13}C-NMR (125MHz, CD_3OD) δ ppm :

129.5 (C-1), 114.2 (C-2), 146.5 (C-3), 144.4 (C-4), 111.4 (C-5), 122.3 (C-6), 34.5 (C-7), 38.3 (C-7'), 40.9 (C-8), 46.5 (C-8'), 178.7 (C-9), 71.3 (C-9'), 129.7 (C-1'),114.3 (C-2'), 144.5 (C-3'), 146.9 (C-4'), 110.9 (C-5'), 121.3 (C-6'), 54.1 (C-10), 85.8 (C-11), 71.6 (C-12), 132.9 (C-1"), 108.9 (C-2"), 118.9 (C-3"), 146.6 (C-4"), 145.2 (C-5"), 114.0 (C-6"),55.7 ($OC\underline{H}_3$), 55.8 ($OC\underline{H}_3$), 55.9 ($OC\underline{H}_3$)

3-2-5 Compound 5의 분리

Subfraction 15D(59.2 mg)를 Chloroform : MeOH (50 : 1→ 30 : 1) 을 용매조건으로 하여 Silica gel 을 이용한 Column chromatography를 실시하고, MeOH : H_2O (2:1)를 전개 용매로 Lichroprep RP-18로 정제하여 Compound 5를 얻었다. 이 화합물은 UV 흡수가 강하게 나타났으며, 10% 황산용액에서 옅은 노란색으로 발색 하였다.

Compound 5 : ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR data (Table1,2)

Yellowish oil

Molecular formula : $C_{21}H_{34}O_7$

EI-MS : *m/z* 374 (M^+, -2H)

$[\alpha]_D^{25}$: - 29.3 ° (C =1.1, $CHCl_3$)

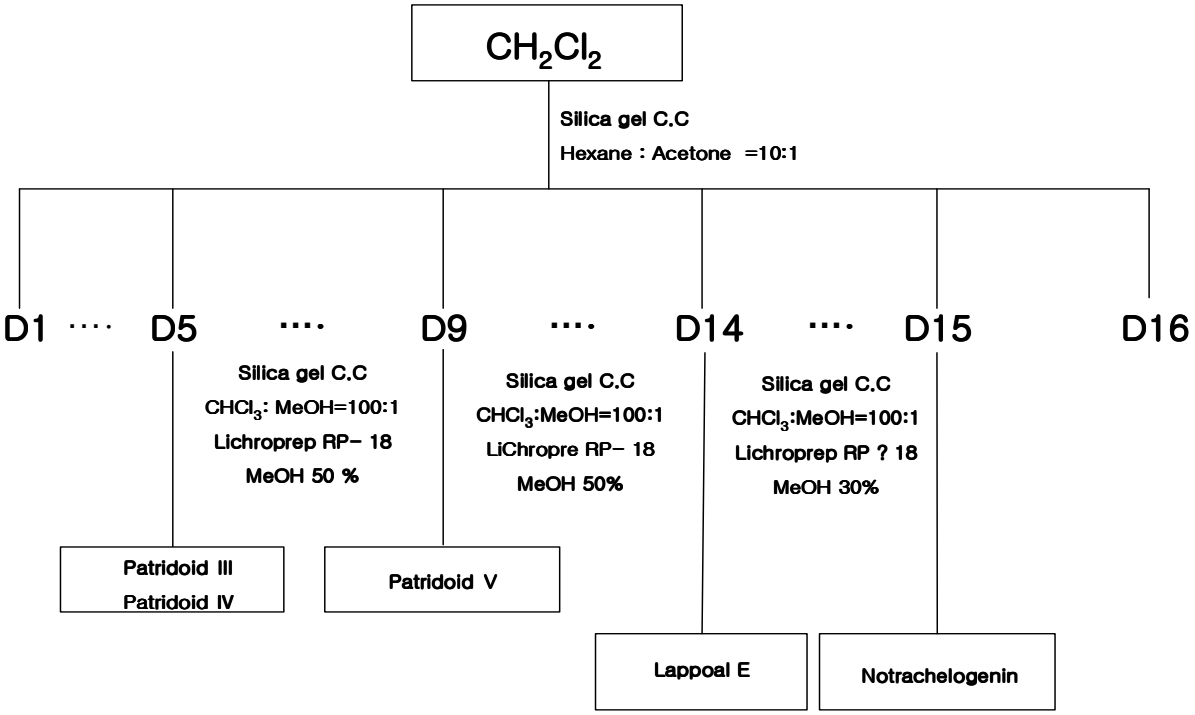
IR V_{max} *(KBr)cm*-1 : 3440, 1770

^{1}H-NMR (500MHz, CD_3OD) δ ppm :

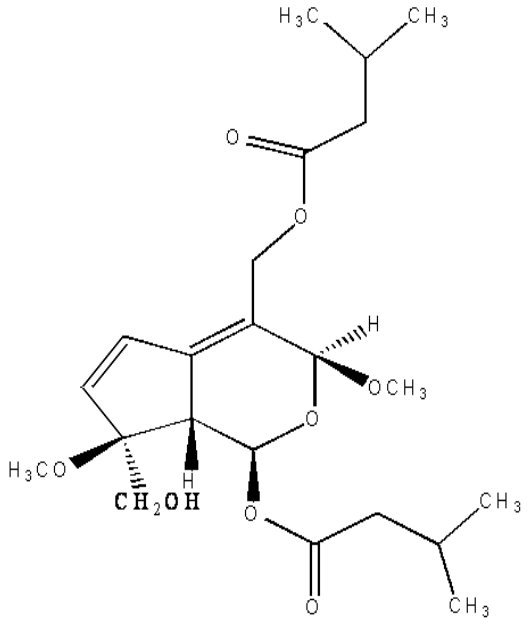
6.60 (1H, d, J= 2.0Hz, H-2), 6.82 (1H, s, H-5), 6.62 (1H, d, J= 1.0 Hz, H-6), 2.91 (1H, s, H-7), 3.07 (1H, d, J= 13.5Hz, H-7), 2.51 (1H, d, J= 2.5 Hz, H-7'), 2.93 (1H, d, J= 7.5 Hz, H-7'), 2.50 (1H, d, J=3.5 Hz, H-8'), 4.00 (1H, dd, J= 6.5, 1.5 Hz, H-9'), 4.02 (1H, dd, J= 3.5, 2.0 Hz, H-9'), 6.70 (1H, d, J= 1.5Hz, H-2'), 6.84 (1H, s, H-5'), 6.63 (1H, d, J= 1.5Hz), 3.84 ($OC\underline{H}_3$), 3.85 ($OC\underline{H}_3$)

^{3}C-NMR (125MHz, CD_3OD) δ ppm :

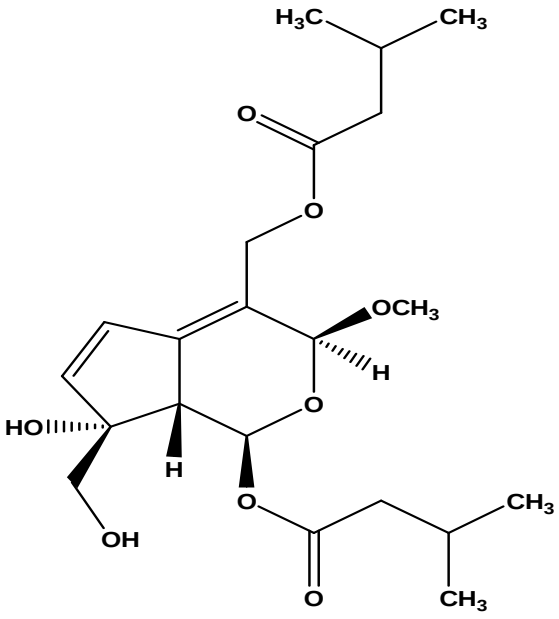
126.0 (C-1), 111.4 (C-2), 146.5 (C-3), 144.3 (C-4), 114.2 (C-5), 121.4 (C-6), 42.1 (C-7), 31.6 (C-7'), 76.4 (C-8), 43.8 (C-8'), 178.4 (C-9), 70.0 (C-9'), 130.2 (C-1'), 112.6 (C-2'), 146.5 (C-3'),145.0 (C-4'), 114.5 (C-5'), 123.1 (C-6'), 55.8 (OCH_3), 55.9 (OCH_3)



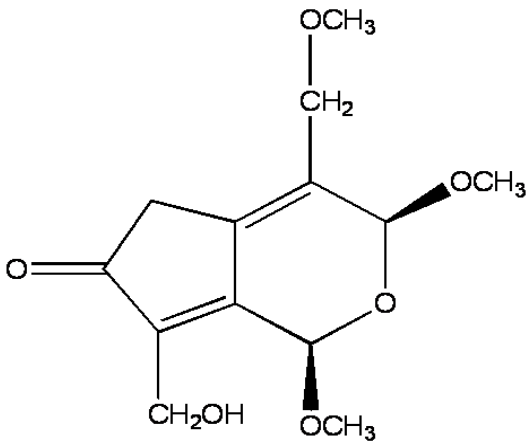
Scheme III. Isolation of Compound 1-5 from the CH_2Cl_2 extract of *Patrinia scabiosaefolia* F.



Compound 1

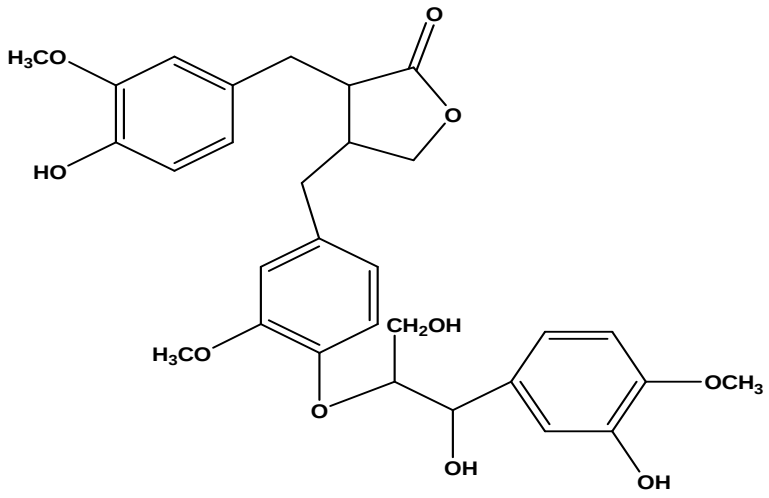


Compound 2

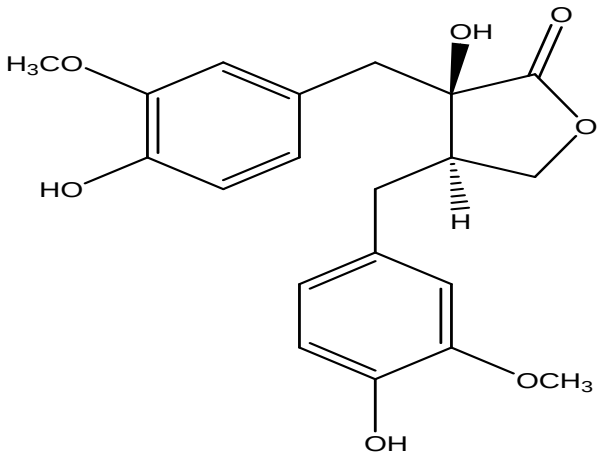


Compound 3

Fig. 1-1 Structure of Compounds 1 - 3 isolated from *Patrinia scabiosaefolia* F.

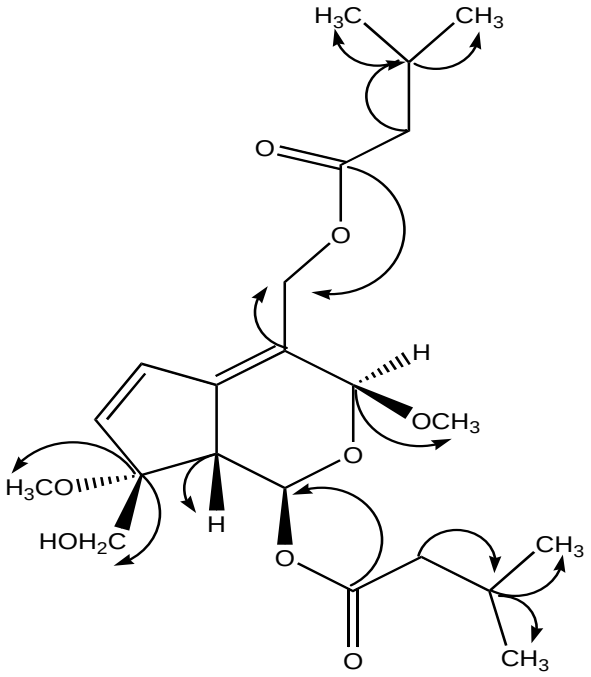


Compound4

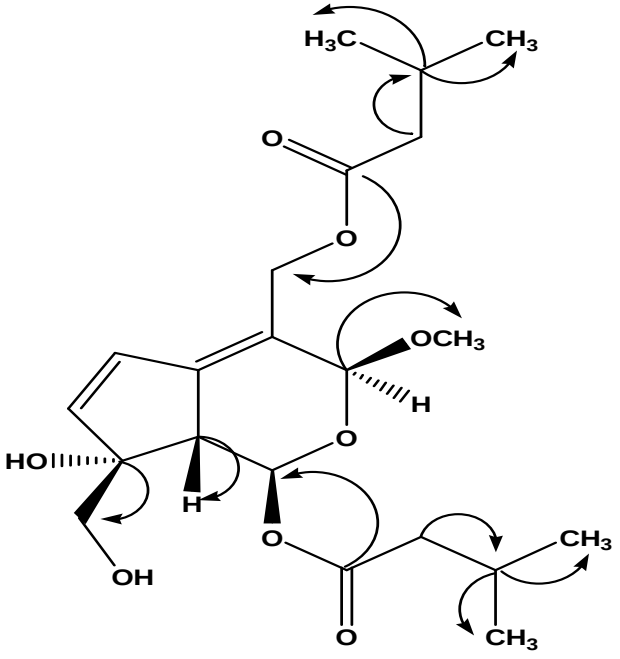


Compound5

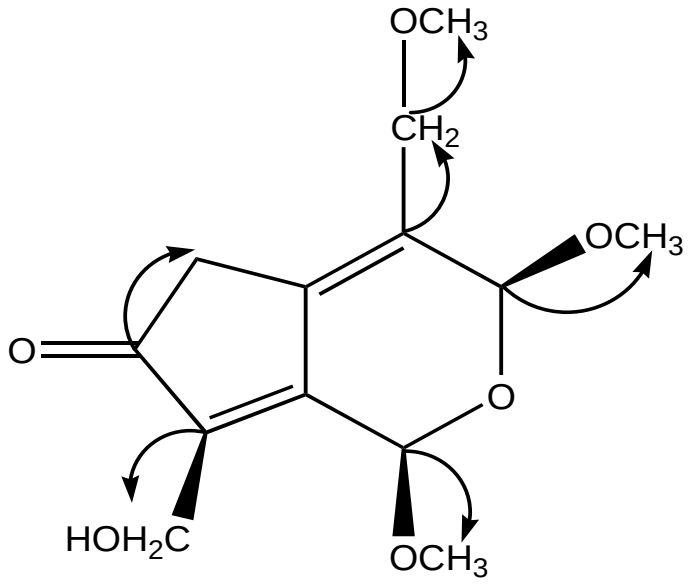
Fig. 1-2 Structure of compounds 4 - 5 isolated from *Patrnia scabiosaefolia* F.



Compound 1



Compound 2



Compound 3

Fig. 2. Selected $^{1}H-^{13}C$ long-range correlations in HMBC spectrum of compounds 1-3

4. 생리활성 실험

4-1. NBT superoxide scavenging assay

NBT super-oxide scavenging assay는 참고문헌을 응용하여 사용하였으며 다음과 같이 실험하였다. 15 mM Na_2EDTA (50 mM KH_2PO_4/KOH, pH 7.4 in d.w.) 용액 20 ㎕, 0.6 nM NBT용액 50 ㎕, 50 mM KOH에 녹인 3 ㎚ hydroxanthine 30 ㎕를 취한 다음 일정농도로 녹인 sample 100 ㎕를 첨가하였다. 여기에 xanthine oxidase (1 unit in 10 ㎖ buffer)용액 50 ㎕를 넣은 후 25 ℃ incubator 안에서 30 분 동안 산화가 일어나도록 반응을 시킨 다음 microplate reader를 통해 570 ㎚ 흡광도에서 측정하였다. 시료를 녹였던 5% DMSO (dimethylsulfoxide) buffer 용액을 control로 하였으며 실험의 표준물질로는 allopurinol을 사용하였다.(18,19)

$$\text{Anti-oxidative activity (\%)} = \frac{\text{rate of control reaction - rate of sample reaction}}{\text{rate of control reaction}} \times 100$$

4-2. Cytotoxicity 실험

이 실험에서 사용한 암세포는 HCT15 (colon adenocarcinoma-직장암주)와 SK-OV-3 (adenocarcinoma, ovary malignant ascites-난소암주)이며 암세포 증식저해활성은 sulforhodamine B (SRB) assay 방법을 활용하였다. 즉 계대중인 세포들을 실험에 사용하기 위하여 우선 trypsin-EDTA 용액으로 용기부착 면으로부터 탈리시키고, 96 well flat bottom microplate (Falcon)에 각 well 당 세포수가 5×10^3 (HCT15), 2×10^4 (SK-OV-3)가 되도록 분주하였다. 분주된 세포들은 5% CO_2 incubator내에서 24 시간 배양하여 바닥에 부착시킨 후 aspirator로 media를 제거하고 6농도의 log dose로 medium으로 희석한 test material 용액들을 세포가 들어 있는 well에 각각 100 ㎕씩 3배수 (triplicate)로 넣어주고 48 시간동안 더 배양하였다. 검체용액은 소량의 DMSO에 녹인 후 배지용액으로 희석하였으며 총 반응 액 중 DMSO의 농도는 1% 이하가 되도록 하였다. 검체용액은 세포에 가하기 전에 miliphore filter로

여과하여 실험의 무균상태를 유지하였다. 세포를 약물과 48 시간 배양한 후 각 well의 medium을 제거하고 10% formalin solution을 100 ㎕씩 가하여 4℃에서 1 시간동안 방치하여 세포들을 plate의 바닥 면에 고정시켰다. 세포의 고정이 끝난 후 plate를 증류수로 5-6회 세척하여 남아있는 formalin용액을 완전히 제거하고 실온에서 남은 물기가 없도록 건조시켰다. 완전히 건조된 plate는 well당 100 ㎕의 1% acetic acid 용액에 0.4% SRB를 녹인 염색용액을 가하여 30 분간 세포를 염색하고 다시 1% acetic acid 용액으로 5-6회 세척하여 세포에 결합하지 않은 과잉의 SRB를 제거하였다. 이렇게 염색된 cell plate들을 다시 실온에서 건조시킨 후 well 당 100 ㎕의 10㎜ trisma base (unbuffered)용액을 가하여 titer plate shaker로 10 분간 shaking하여 염색액을 용출시킨 후 micro plate reader를 사용하여 540㎚에서 흡광도를 측정하였다. 암세포들에 대한 약물의 효과를 계산하기 위하여 약물을 가하는 시점에서 세포 수(Tz, zero time)와 약물 대신 동량의 배지만을 가하여 48시간 배양했을 때의 세포 수(C, control) 및 각 농도의 약물과 함께 48 시간 배양했을 때의 세포 수(T, test)를 각각 측정하여 다음의 수식에 따라 항암활성을 계산하였다. 즉 Tz>T인 경우에는 [(T-Tz)/(C-Tz)]×100으로 계산하였고, Tz<T인 경우에는 [(T-Tz)/Tz]×100의 수식으로 계산하였다. 이렇게 계산된 값들로부터 LOTUS program의 data regression tool을 이용하여 약물이 암세포의 증식을 50% 저해하는 농도인 50% effective dose (IC_{50})를 계산하였다.

4-3. MG-63 cell line에서 hIL-6의 유리 확인

세포주는 10% FBS (fetal bovine serum)가 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 culture dish에 증식시킨 MG-63 세포를 24-well plate에 적정수의 세포(3×10^4)를 500 ㎕씩 접종한 후 하루 동안 incubation하고 배지를 교체하였다. 여기에 TNF(Tumor Necrosis Factor)-α와 SRB assay를 통해 얻은 세포독성이 없는 농도의 sample을 처리한 후 37℃ incubator에서 배양한 후 24 시간과 48 시간 뒤 각각 70 ㎕씩 배지를 채취하여 냉동 보관하였다. 96-well plate에 1차 antibody 100 ㎕(antihuman IL-6 2 ㎍/㎖ in 0.1M $NaHCO_3$)을 넣은 후 4℃에서 overnight하여 1차 antibody가 96 well plate에 부착되도록 하였다. 결합되지 않은 1차 antibody를 씻어내기 위해 washing solution [0.05% Tween 20 in (PBS) phosphate buffered saline] 100 ㎕로 3번 씻어낸 후

blocking solution (3% bovine serum albumin (BSA) in PBS) 200 ㎕를 처리하고 실온에서 2 시간 동안 방치한 후 washing solution 200 ㎕로 2번 씻어내었다. 위에서 24 시간 후와 48 시간 후에 채취한 배양액 50 ㎕와 blocking solution 50 ㎕를 넣어 실온에서 4 시간 또는 4℃에서 overnight하여 1차 anti-body와 결합하도록 하였다. 100 ㎕의 washing solution으로 4번 세척한 후 100 ㎕의 2차 antibody (biotin conjugated rat anti-human IL-6 1 ㎍/㎖ in blocking solution)를 첨가 하여 45 분 동안 결합시킨 뒤 결합되지 않은 2차 antibody를 100 ㎕의 washing solution으로 6번 세척하였다. 100 ㎕의 Streptavidin HRP (0.1% BSA, 0.05% Tween 20 in tris buffered saline, pH 7.3)를 첨가하여 20 분 동안 결합시킨 뒤 washing solution으로 6번 세척한다. TMB (Tetra Methyl Benzidine) 100 ㎕를 넣어 발색시킨 즉시 micro plate reader를 사용하여 450㎚ 파장에서 흡광도를 측정하였다. 1% DMSO와 TNF-α (15 ng/㎖)가 들어갔을 때 hIL-6의 유리정도(%)를 control로 하였으며 실험의 표준물질로는 dexamethasone을 사용하였다. hIL-6의 유리, 확인은 control에 대한 상대적인 퍼센트 즉, rate of sample reaction/rate of control × 100으로 표시하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. Compound 1 의 구조

Compound 1은 Yellowish oil의 pure compound 상태로 분리 되었다. $[\alpha]_D^{25}$는 -5.955°(C= 1.0, MeOH) 측정 되었고, 분자식은 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, HR-FAB-MS (*m/z*,427.3794,M+Na^+) 로부터 $C_{22}H_{34}O_8$ 결정되었다. IR spectrum으로부터 3450,1740,1290,1100 $^{-}$cm의 Functional group를 확인 하였다. ^{1}H-NMR spectrum으로부터 δ6.8,6.3에서 H-6, H-7 olefinic proton이 doublet (J= 5,5 Hz)로 나타나며, δ3.6,3.7,4.6,4.8에서 H-10, H-11 methylene proton이 δ3.6을 제외한 모두 doublet (J= 11.0, 13.0, 12.5 Hz) 나타나고 있다. δ 0.8~2.2 사이에서 2쌍의 isovaleroyloxy group의 기인하는 signal들이 나타나고 있다. 2개의 acetal proton H-1, H-3은 δ6.5에서 J=7.0 Hz의 doublet으로 δ5.2는 singlet으로 나타나고 있으며 δ2.9에서 J=6.5 Hz의 doublet으로 나타나고 있는 H-9 signal 확인 할 수 있으며, H-1과 H-9는 서로 Cross peak를 이루고 있다. 이외에도 methoxyl groups에 기인하는 3H 분의 singlet이 각 δ3.4, 3.0에서 나타나고 있다. ^{13}C-NMR spectrum에서 olefinic carbon을 δ132.5, 138.8에서 나타나고 있다. C-1, C-3 2개의 acetal carbon signal을 δ90.4 , 98.4에서 나타나고, C-4, C-5 signal을 δ124.3, 143.0에서 나타나고 있다. δ67.2와 60.0에서 C-10,C-11의 signal들을 타나나고 있다. C-9 signal을 δ45.4에서 나타나고 있다. 2쌍의 isovaleroloxy group에 기인하는 signal이 δ(171.9, 43.2, 25.5, 22.3, 22.3), δ(172.8,43.5, 25.6, 22.4, 22.4)에서 나타나고 있다.

이 화합물의 구조는 HMBC와 NOESY spectrum data를 분석하여 결정 하였다. δ171.9 (C-1')의 isovaleroyloxy group carbon signal은 δ 6.2 (H-1)에 타나나는 acetal proton에 기인하는 proton signal 과 long-range correlation을 나타나고 있다. δ172.8 (C-1")의 isovaleroyloxy group carbon signal은 δ 4.6, 4.8 (H-11)에 나타나는 methylene proton signal과 long-range correlation을 나타나고 있다. δ98.4 (C-3), 87.6 (C-8)의 carbon signal은 각δ 3.4, 3.0에서 나타나는 methoxyl group에 기인하는 proton signal 과 correlation을 나타나고 있다. δ87.6 (C-8)의 carbon signal은 δ 3.6, 3.7(H-10)에 나타나는 methylene group에 기인하는 proton signal과 correlation을 나타나며, δ143.0 (C-4)의 carbon signal은 δ 4.6,4.8 (H-11)에서 나타나는 oxygen-bearing methylene proton signal과 correlation 나타나고 있다. δ67.2 (C-10)의 carbon signal은 δ2.9 (H-9),

δ6.3 (H-7)의 proton signal과 correlation을 나타나고 있다. NOESY spectrum에서 H-1의 coupling constant가 J=7,0 Hz의 doublet으로 나타나는 것으로 보아 C-1에 위치한 isovaleryloxy group이 β배향인 것을 알 수 있고, H-9역시 H-1 coupling constant에 의해 β배향인 것을 알 수 있고 H-1, H-9 는 서로 axial-axial 관계인 것을 알 수 있다. C-3, C-8 에 위치한 methoxyl group의 배향은 β와 α인 것을 알 수 있으며 C-8 위치에 methoxyl group이 존재함으로써 compound 1은 신규 화합물로써 인정 되며 patridoid III라 명명 하였다.

2. Compound 2의 구조

compound 2는 Yellowish oil 상태의 pure compound 상태로 분리 되었다. $[\alpha]_D^{25}$는 51.970°(C=0.075, MeOH) 측정 되었고, 분자식은 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR ,HR-FAB-MS (m/z,381.1913,M-CH_3)로부터 $C_{22}H_{34}O_8$로 결정되었다. IR spectrum 으로부터 3450,1740,1290,1100 $^{-}$cm의 Functional group를 확인 하였다. ^{1}H-NMR spectrum에서 δ6.7, 6.3에서 J= 5.5 Hz의 doublet H-6,H-7 olefinic proton으로 나타나며, δ3.5, 3.7에서 H-10의 methylene proton이 J= 11.0, 12.5 Hz의 doublet으로 나타나고, δ 4.6, 4.8에서 H-11의 methylene proton이 J= 11.0, 12.5 Hz의 doublet으로 나타나고 있다. δ0.8~2.2 사이에서 2쌍의 isovaleroyloxy group의 기인하는 signal들이 나타나 있다. 2개의 acetal proton 중 H-1은 δ6.2에서 J=7.0 Hz의 doublet으로 나타나고, H-3은 δ5.2에서 singlet로 나타나고 있다. 2.8에서 doublet 으로 나타나 있는 H-9 (J=7.5 Hz) signal 확인 할 수 있으며, H-1오 H-9는 서로 Cross peak를 이루고 있다. 이외에도 OCH_3 group signal이 δ3.4에서 나타나고 있다. ^{13}C-NMR spectrum에서 olefinic carbon이 δ130.3, 141.4에서 나타나고 있다. C-1, C-3 2개의 acetal carbon signal이 δ91.6, 98.8에서 나타나며, C-4, C-5 signal을 δ143.0, 125.4에서 나타나고 있다. δ68.0과 60.1에서 C-10, C-11 signal을 나타나고 있다. C-9 signal을 δ46.0에서 나타나고 있다. 2쌍의 isovalerloxy group에 기인하는 signal이 δ (171.9, 43.5, 25.5, 22.3, 22.3), δ(172.8,43.2, 25.6, 22.4, 22.4)에서 나타나고 있다. HMBC spectrum data에서 δ172.2 (C-1')의 isovaleroyloxy group carbon signal 은 δ6.2 (H-1)에 나타나는 acetal proton에 기인하는 proton signal 과 correlation을 나타나고 있다. δ172.8 (C-1")의 isovaleroyloxy group carbon signal은 δ4.6, 4.8 (H-11)에 나타나는 methylene proton signal과

correlation을 나타나고 있다. δ98.4 (C-3)carbon signal은 δ3.4에 나타나는 methoxyl group에 기인하는 proton signal 과 correlation을 나타나고 있다. δ87.6 (C-8)의 carbon signal은 δ3.5, 3.7(H-10)에 나타나는 hydroxymethylene group에 기인하는 proton signal과 correlation을 나타나며, δ143.0 (C-4)의 carbon signal은 δ4.6, 4.8 (H-11)에서 나타나는 oxygen-bearing methylene proton signal과 correlation을 나타나고 있다. δ68.0 (C-10)의 carbon signal은 δ2.8 (H-9), δ6.3 (H-7)의 proton signal과 correlation을 나타나고 있다. NOESY spectrum data 에서 H-1의 coupling constant가 J= 7.0Hz의 doublet으로 나타나는 것으로 보아 C-1에 위치한 isovaleryloxy group이 β배향인 것을 알 수 있고, H-9역시 H-1 coupling constant에 의해 β배향인 것을 알 수 있고 H-1, H-9 는 서로 axial-axial 관계인 것을 알 수 있다. C-3에 위치한 methoxyl group의 배향은 β인 것을 알 수 있으며 C-8 위치에 hydroxy group은 α배향을 나타낸다. 이 화합물에 C-8에 proton이 hydroxy group으로 치환되고 C-10위치에 oxygen-bearing methylene group이 존재함으로써 compound 2는 신규 화합물로써 인정 되며 이를 Patridoid IV로 명명하였다.

3. Compound 3의 구조

Compound 3은 Yellowish oil상태의 pure compound 상태로 분리 되었다. $[\alpha]_D^{25}$는 3.208°(C = 1.05, MeOH)로 측정 되었고, 분자식은 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR와 HR-EI-MS (m/z, 271.1182, $[M+H]^+$)로부터 $C_{13}H_{10}O_6$ 로 결정 되었다. IR spectrum으로부터 3450,1668,1290, 1290,1100 $^{-}$cm의 Functional group를 확인 하였다.^{1}H-NMR spectrum data에서 iridoid의 특징적인 acetal proton δ5.8, 5.2에서 singlet signal을 나타내며, 각각 H-1, H-3에 위치한다. 3개의 methylene proton 중 H-6은 δ3.4(2H)에서 J= 8.0Hz의 doublet으로 나타내고, H-10은 δ4.4(2H)에서 J=13.0 Hz의 doublet을 나타나고, H-11은 δ4.0에서 J=13.0 Hz의 doublet으로, δ4.1에서 J= 12.5의 doublet을 나타나고 있다. 이 외에도 H-1, H-3, H-11에 위치한 methoxyl group이 δ3.6, 3.5, 3.3에서 나타나고 있다. ^{13}C-NMR spectrum data에서 C-7 carbonyl carbon이 δ203.4에서 나타나고 있다. C-1, C-3 acetal carbon을 δ93.4, 96.5에서 나타나며, δ132.0, 130.0에서 C-4, C-5 signal을 나타나고 있다. C-10, C-11 methylene carbon을 δ55.4, 69,4에서 나타나고 있다. C-1, C-3, C-11에 위치한 methoxyl group을 δ56.2, 56.4, 68.5에서 나타나고 있다. 이 화합물의

구조는 HMBC, NOESY spectrum data 분석하여 결정 하였다. 3개의 methoxyl group은 각각 C-1 δ93.4와 δ3.6 (OCH_3), C-3의 δ96.5 와 δ3.5 (OCH_3), C-11 δ 69.4 와 δ3.3 (OCH_3) 서로 correlation을 나타나고 있다. C-4의 δ 132.0 의 carbon signal은 δ4.0, 4.1(H-11), C-8의 δ140.0 의 carbon signal은 δ 4.4(H-10) correlation을 나타나고 있다. NOSEY spectrum으로부터 C-1에 위치한 methoxyl group의 배향은 β이며 C-3에 위치한 methoxyl group 역시 β 배향을 나타나고 있다. compound3 C-1, C-3, C-11 위치한 methoxyl group이 존재함으로써 신규 화합물로 인정되며, compound 3 Patridoid Ⅴ라 명명하였다.

4. Compound 4의 구조

compound 4는 Yellowish oil 상태로 pure compound로 분리 되었다. $[\alpha]_D^{20}$: -26.56° 로 측정 되었고, 분자식은 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, FAB-MS (*m/e* M+, $-H_2O$: 536)로부터 $C_{30}H_{34}O_{10}$ 결정되었다. IR spectrum 으로부터 3430, 1760, 1600, 850, 810 -cm의 functional group을 존재 확인 하였다.

^{1}H-NMR spectrum에서 δ6.40 ~ 6.80에서 3개의 1-3-4-trisubstituted aromatic ring에 기인하는 proton signal을 나타나고 있다. δ3.810, 3.817, 3.907에서 각각 3개의 methoxyl group에 기인하는 3H분의 singlet이 나타나고 있다. δ3.8에서 J=7.5,7.5 Hz의 dd으로 그리고 δ4.1에서 J= 2.0 Hz의 doublet이 H-9'의 methylene proton signal을 나타나고 있다. H-12 oxygenated methine proton이 J= 4.5 Hz의 doublet 나타나며, H-11 methine proton이 J= 4.5, 4.5 Hz의 dd을 나타나고 있다. oxygenated methylene proton, H-10이 δ3.8, 4.2에서 각각 J= 3.5Hz의 doublet과 J= 7,7 Hz의 dd을 나타나고 있다. ^{13}C-NMR spectrum으로부터 carbonyl carbon δ178.7 (C-9)에서 나타나고 있다. δ129.5, 114.2, 146.5, 144.4, 111.4, 122.3, 129.7, 114.3, 144.5, 146.9, 110.9, 121.3, 132.9, 108.9, 118.9, 146.6, 145.2, 114.0에서 aromatic ring에 기인하는 signal이 나타나고, aromatic ring에 존재하는 methoxyl group 기인하는 55.7, 55.8, 55.9 carbon signal을 나타나고 있다. C-9', C-10 oxygen bearing methylene carbon signal을 δ 71.3, 76.6에서 나타나고, C-7,C-7' methylene carbon signal이 δ34.5, 38.3에서 나타내고 있다. oxymethine carbon, C-12는 δ85.8에서 나타나고 있으며, C-8, C-8', C-10 위치한 methine carbon δ 40.9, 46.5, 54.1에서 나타나고 있다. 위상의 결과로부터 compound4는 Butyrolactone sesquilignan, Lappaol

E 결정 하였고 문헌의 ^{13}C-NMR, ^{1}H-NMR 비교한 결과 일치 하였다.[20~24] compound 4는 ***Patrinia scabiosaaefolia*** **F.**로부터 처음 분리 된 물질이다.

5. Compound 5의 구조

compound 5는 yellowish oil 상태로 pure compound로 분리 되었다. $[\alpha]_D^{25}$: -29.3° (C=1.1, $CHCl_3$)로 측정 되었고, 분자식은 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, 와 EI-MS (*m/z*,374)로 부터 $C_{21}H_{34}O_7$ 결정 되었다. IR spectrum으로부터 3440,1770^{-}㎝의 Functional group를 확인 하였다. ^{1}H-NMR,^{13}C-NMR (Table1-2) 와 HSQC spectrum data로부터 결정되었다. ^{1}H-NMR spectrum으로부터 δ 6.40~6.80에서 2개의 1-3-43-trisubstituted aromatic ring group에 기인하는 proton signal을 나타나고 있다. δ3.84, 3.85에서 aromatic ring group에 존재 하는 methoxyl group의 proton signal을 나타나고 있다. Methylene proton signal 2개 중 H-7이 δ2.91에서 singlet으로 , δ3.07에서 J= 13.5 Hz의 doublet으로 나타나고, H-7′의 proton signal이 δ2.51에서 J= 2.5 Hz의 doublet으로 나타나고, δ2.93에서 J= 7.5 Hz의 doublet으로 나타나고 있다. H-9'의 methylene proton signal을 각각 δ3.98에서 J= 6.5, 6.0 Hz의 dd로, δ4.00에서 J= 3.5, 2.0 Hz의 dd을 나타나고 있다. H-8'의 methine proton이 δ2.5에서 J= 3.5, 3.5 Hz의 dd을 나타나고 있다. ^{13}C-NMR spectrum으로부터 carbonyl carbon δ178.4에서 나타나고 있다. δ126.0, 111.4, 146.5, 144.3, 114.2, 121.4, 130.2, 112.6, 146.5, 114.5,123.1에서 aromatic ring에 기인하는 signal이 나타났고, methoxyl group에 기인하는 δ55.8, 55.9 carbon signal을 나타내고 있다. C-7, C-7' methylene carbon signal을 δ43.1, 31.6에서 나타나며, C-8 carbon signal은 δ76.4나타나며, hydroxy group을 가지고 있다. C-8' methine carbon signal을 δ43.0에서 나타나고 있다. 위 결과를 비교한 결과 compound 5는 Butyrolactone 인 Nortrachelogenin 결정 하였고, 문헌의 ^{13}C-NMR, ^{1}H-NMR 비교한 결과 일치 하였다.[25~29] compound 5는 ***Patrinia scabiosaaefolia*** **F.**로부터 처음 분리 된 물질이다.

6. 생리활성 결과

6-1. NBT superoxide scavenging assay

마타리의 MeOH, CH_2Cl_2, EtOAc, n-BuOH, H_2O extract에 대하여 NBT superoxide scavenging assay에 의한 anti-oxidative activities를 검토하였

다. 그 결과 100㎍/㎕인 농도에서 CH_2Cl_2 (19.3%) 분획이 활성이 있었고, 50 ㎍/㎕인 농도에서는 CH_2Cl_2 (22.2%), 25㎍/㎕인 농도에서는 CH_2Cl_2 (68.6%) 분획이 활성이 있는 것으로 나타났다. 여기서 마타리의 CH_2Cl_2 분획은 고농도 강한 anti-oxidative activities를 나타내어 마타리의 CH_2Cl_2 분획에서 강한 anti-oxidative activities가 있는 화합물이 있는 것으로 판단된다.

6-2. Cytotoxicity assay

HCT15와 SK-OV-3, 두 종의 인체유래 암 세포주에 대한 시험관내 세포성장 저해효과를 SRB (sulforhodamine B)방법으로 마타리의 MeOH, CH_2Cl_2, EtOAc, n-BuOH, H_2O extract에 대하여 검색하여 본 결과 CH_2Cl_2의 분획이 HCT15와 SK-OV-3 암 세포주에 대하여 각각 10.7 (5×10^3 cell/㎖)과 13.1 (2×10^4 cell/㎖)인 IC_{50} 값을 나타내어 마타리 CH_2Cl_2 추출물분획 중에서 우수한 cytotoxic activity를 나타내는 화합물이 있는 것으로 판단된다.

6-3. MG-63에서 hIL-6의 유리 확인

Compound 1, 2, 3, 4, 5에 대해 MG-63 세포에서 hIL-6의 유리정도(%)를 검토하였다. 그 결과 compound 5은 MG-63 세포로부터 hIL-6의 유리가 현저히 감소하는 것으로 나타났다. compound 4,5에 대한 각각의 hIL-6의 유리정도는 66.1±2.5, 18.7±8.3로 나타났다

Ⅳ. 결 론

마타리(패장)는 콩으로 만든 장이 오래되어 썩은 냄새가 나기 때문에 생긴 이름이다. 또한 어린 싹을 채취하여 쪄서 나물로 먹는데 맛이 약간 쓰고 오래된 장 냄새가 나기 때문에 고채라고 불렀다. 이 약은 특이한 냄새가 있으며 맛은 맵고 쓰며 성질은 약간 차다. 마타리 (패장)는 혈의 순환이 되지 않고 외부 충격으로 어혈이 질 때 사용하며 종기, 맹장염, 폐 농양으로 인한 해수, 농혈이 있을 때, 어혈로 인한 동통, 산후 어혈복통에도 쓴다. 성분에 관한 연구를 보면 전초의 oil, 건조된 과지 sigigrin, morroniside, loganin, villoside, oleanolic acid, hederagenin, β-sitosterol-β-d-glucoside, 다종의 saponin, alkaloid, tannin, 전분, Coumarins, iridoids, Flavonoids 등이 연구 보고되었고, 최근 진정과 최면작용의 유효성분인 Patrinene과 isopatrinene 등이 보고되었다. 마타리(***Patrinia scabiosaefolia*** **F.**) CH_2Cl_2분획에서 새로운 3개의 Iridoids와 이미 분리 구조 구명 된 2개의 lignan을 분리하였다. Compound 1, Compound 2는 2쌍의 isovaleryloxy group과 Compound 1(C-10), oxygen-bearing methylene group을 가지고 있으며, Compounds 2(C-8), methoxyl group을 가지고 있다. 그리고 compound 3 역시 Iridoid 이며, 3개의 methoxyl group을 C-1, C-3, C-11 위치에 가지고 있다. 위 3개의 새로운 iridoids를 Patridoid Ⅲ, Patridoid Ⅳ, PatridoidⅤ라 이름 붙었다.

Compound 4, 5는 Sesquilignan, dibenzylbutyrolactone type 이다. Compound 4, Sesquilignan-Lappaol E 이며, 이미 ***Arctium Lappa*** **L.**에서 분리 구조 분석 되였다. 이 구조는 3개의 aromatic ring, 1개의 Carbonyl carbon 그리고 1개의 oxygenmethylene carbon 가지고 있는 구조 이다. Compound 5, Dibenzylbutyrolactone-Nortracheolgen 이 compound 역시 이미 다른 식물에서 분리 구조 분석이 되었다. Compound 5, 2개의 aromatic ring 그리고 oxygen-bearing carbon을 가지고 있는 구조이다. 위 5개의 Compounds 모두 단일 물질로 분리 되었고, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR , HSQC, HMBC, NOESY 의해 구조 분석되었다.

그리고 마타리의 CH_2Cl_2 분획으로부터 분리한 화합물 compound 4. compound 5를 세포독성이 없는 농도에서 TNF-α에 의해 유도된 hIL-6의 억제작용을 알아보고자 하여 MG-63 세포주을 이용한 hIL-6의 유리, 억제 실험을 실시한 결과 compound 4, compound 5에 대한 hIL-6이 유리정도는 66.1±2.5%, 18.7

±8.3% 이다. 그 결과 compound 5는 MG-63 세포주로부터 hIL-6의 유리가 현저히 감소하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 compound 5는 염증 반응 및 hIL-6의 과다 발현으로 인한 질병을 개선시키는 효과가 있을 것으로 판단된다.

v. 참고문헌

1) 김 태 정. 『한국의 자원도감 식물Ⅳ』, 서울대학교충판부, 1996

2) 배 기 환. 『원색도감 ·한국의 자연시리즈 13 한국의 약용식물』, 서울: 교학사2000

3) Lee Y. N., ""Flora of Korea," " Kyo-Hak Publishing Co., Ltd., Seoul,1996, p. 756.

4) Lee T. B., ""Illustrated Flora of Korea," " Hyangmoon Publ. Co., Seoul,1980, p. 714.

5) Sam Sik Kang, Ju Sun Kim. A Triterpenoid Sapoinn from *Patrinia scabiosaefolia J. Nat. Prod.* **60** 1060-1062 (1997)

6) Choi J. S., Woo W. S., *Arch. Pharmacal Res.*, **7**, 121-126 (1984).

7) Kouno I., Koyama I., Jiang Z.-H., Tanaka T., Yang D.-M., *Phytochemistry*,**40**, 1567--1568 (1995).

8) Kouno I., Yasuda I., Mizoshiri H., Tanaka T., Marubayashi N., Yang D.-M., *Phytochemistry*, **37**, 467--472 (1994).

9) Larchenko V. A., Fursa N. S., Drozd G. A., *Khim. Prir. Soedin.*, **1979**, 852--853 (1979).

10) Bagchi A., Oshima Y., Hikino H., *Planta Med.*, **54**, 87--88 (1988).

11) Boros C. A., Stermitz F. R., Harris G. H., *J. Nat. Prod.*, **53**, 72--80(1990).

12) Kamel M. S., Mohamed K. M., Hassanean H. A., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K., *Phytochemistry*, **55**, 353--357 (2000

13) Won Sick Woo, Jae Sue Choi, Otto Seligmann. Sterol and Triterpenoid Glycosides from the Roots of *Patrinia Scabiosaefolia Phtochemistry* **22** 1045-1047 (1983)

14) Ren Bo An, Byung Sun Min, Min Kyun Na, Ki Hwan Bea. Iridoid Esters from *Patrinia Scaniculaefolia Chem. Pharm. Bull.* **51** 583-585(2006)

15) Chang S. W. ,D. D. s., Beak S.H., M. S. D., Ph. D., Kim C. H and Lim S. S. . interleukin-6 and interleukin-10 in experimentally induced rat pulpal inflammation. 대한치과보존하학회지, **27** 232-238 (2002)

16) Ragab A. A., Nalepka J. L., Bi Y. and Greenfield E. M. . cytokine synergistically induce osteoblast differentiation support by immortalized or nermal calvbarial eells. Am. J. Physiol. cell. Physiol. **283** 679-687 (2002)

17) Mysliwice J., Kretowski A., Topolska J., Stepien A. and Kinalska I.. The influence of corticosteroids on IL-6/IL-6R system in patients with graves ophthalmopathy. Pol. Arch. Med. Wewn. **108** 739-744 (2002)

18) Piao M. s., Kim M. R., Lee D. G., Park Y. K., Harm K. S., Moon Y.H. and Woo E. R., antioxidative constituents from Buddleia officinalls. *Arch. Pharm. Res.* **26** 453-457 (2003)

19) Kirby A. J. and schmidt R. J. the antioxidant activity of chinese herbs for eczema and the placebo herbs-I. *Ethnopharmacology* **56** 103-108 (1997)

20) Tsutomu Warashina, Yoshimi Nagatani, Tadataka Noro. Further constituents from the bark of Tabebuia Impetiginose. *Phytochemistry* **66** 589-597 (2005)

21) Akitami Ichihara, Yoshiaki Numata, seiji Kanai, Sadao Sakamura. New Sesquilignans from *Arctium* lappa L. The Structure of Lappoal C,D and E. *Agric. Biol. Chem.* **41** 1813-1812 (1977)

22) Akitami Ichihara, Yoshiaki Numata, seiji Kanai, Sadao Sakamura. STRUCTURES OF LAPPAOL OF F AND H, DILIGNANS FROM *ARCTIUM LAPPA* L. *Tetrahedron Letters*. **33** 3035-3038 (1978)

23) Akitami Ichihara, Kengo Oda, Yoshiaki Numata, Sadao Sakamura. Lappaol A and B, Novel Lignans from *Arctium* Lappa L. *Tetrahedron Letters.* **44** 3961-3964 (1976)

24) Akitami Ichihara, Yasuji Nakamura, Hirokazu Kawgishi, Sadao Sakamura. Stereochemistry of Lappaol, A and F. *Tetrahedron Letters.* **39** 3735-3736 (1979)

25) Akitami Ichihara, seiji Kanai, Yasuji Nakamura, Sadao Sakamura. Structure of Lappaol F and H , Dilignans from *Arctium* Lappa L. *Tetrahedron Letters.* **33** 3035-3038 (1978)

26) So Young Park, Seong Su Hong, Xiang Hua Han, Ji Sang Hwang, Dong gho Lee, Jai Seup Ro, Bang Yeon HWang. Lignans from *Arctium lappa* and their Inhibition of LPS-Induced Nitric Oxide Production. *Chem. Pharm. Bull.* **55** 150-152 (2007)

27) Akitami Ichihara, Yoshiaki Numata, seiji Kanai, Sadao Sakamura. New Sesquilignans from Arctium lappa L. The Structureof Lappaol C,D and E *Agric. Biol. Chem.* **41** 1813-1814 (1977)
28) Li-Yan, Noriko Unehara, Susumu Kitanaka. Lignans from roots of Wikstroemia indica and their DPPH Radical Scavenging and Nitric Oxide Inhibitory Activities. *Chem. Pharm. Bull.* 1348-1351 (2005)
29) Na Li, Jian Lin Wu, Toshiaki Hasegawa, Jun ichi Sakai, Li Yan Wang, Saori KaKuta. Bioactive Dibenzylbutyrolactone and Dibenzylbutanediol Lignans from *Peperomia Duclouxii*. *J. Nat. Prod.* **66** 234-239 (2006)

APPENDIX

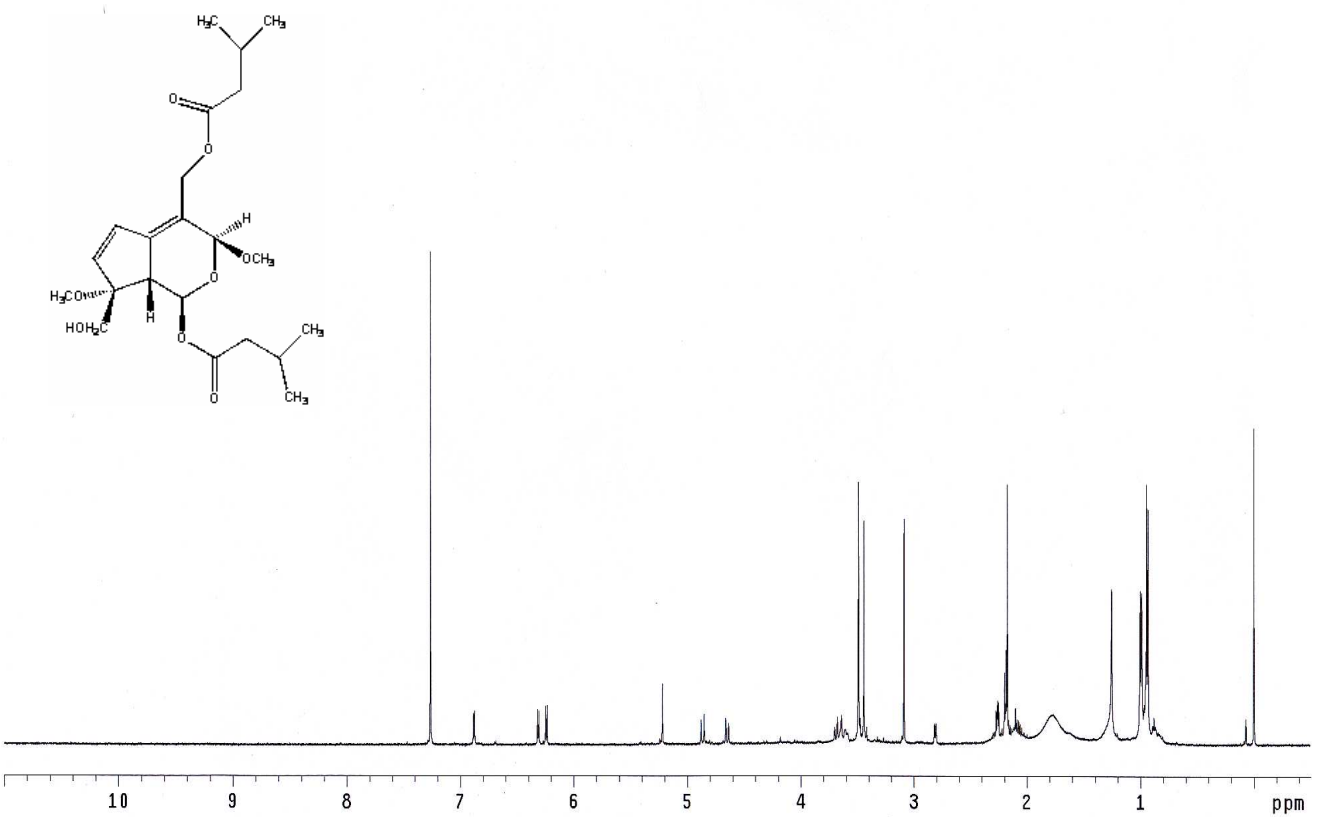


Fig. 3. ^{1}H-NMR spectrum of compound 1 (500MHz, $CDCl_3$)

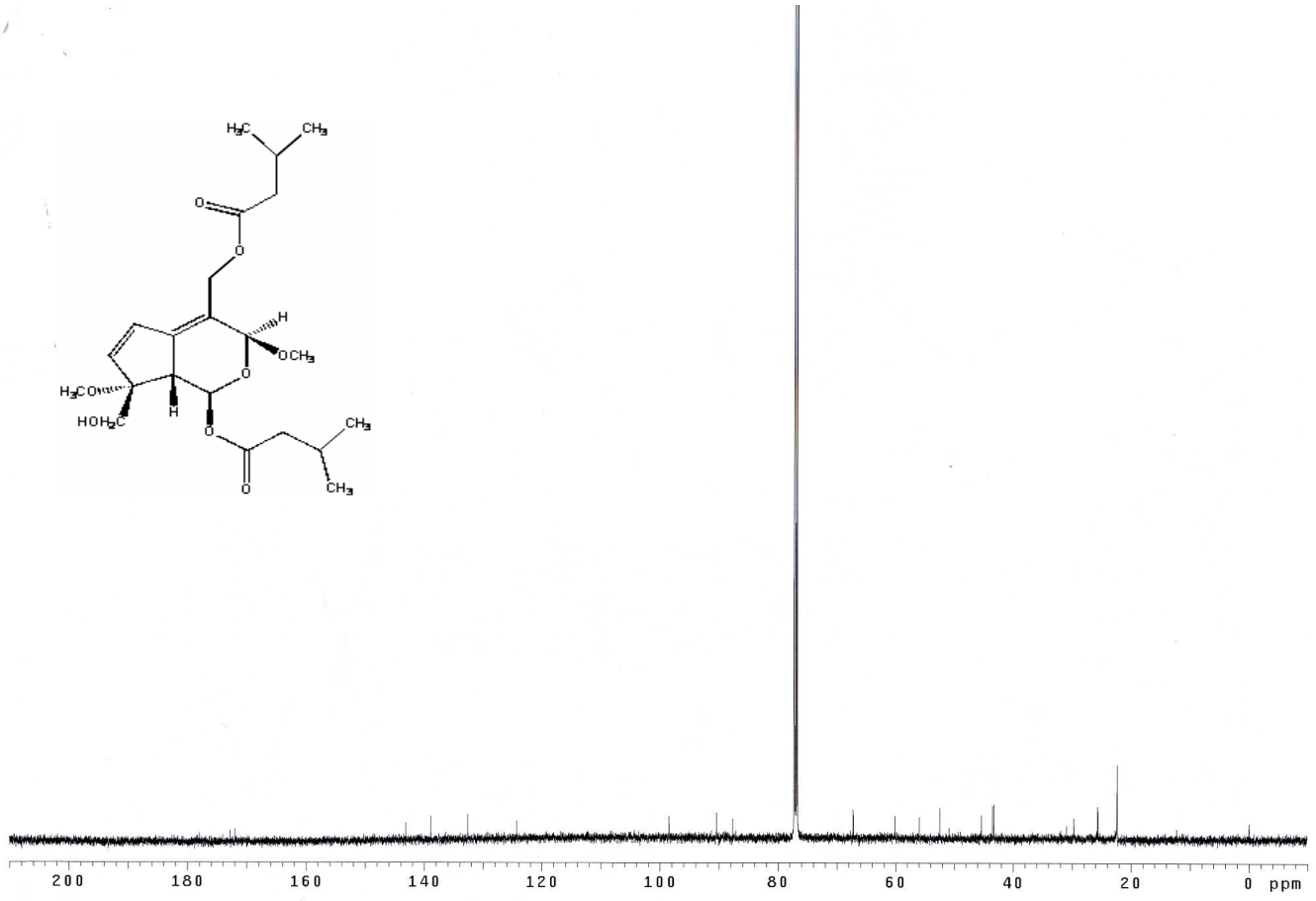


Fig.4. ^{13}C-NMR spectrum of compound 1 (125MHz, $CDCl_3$)

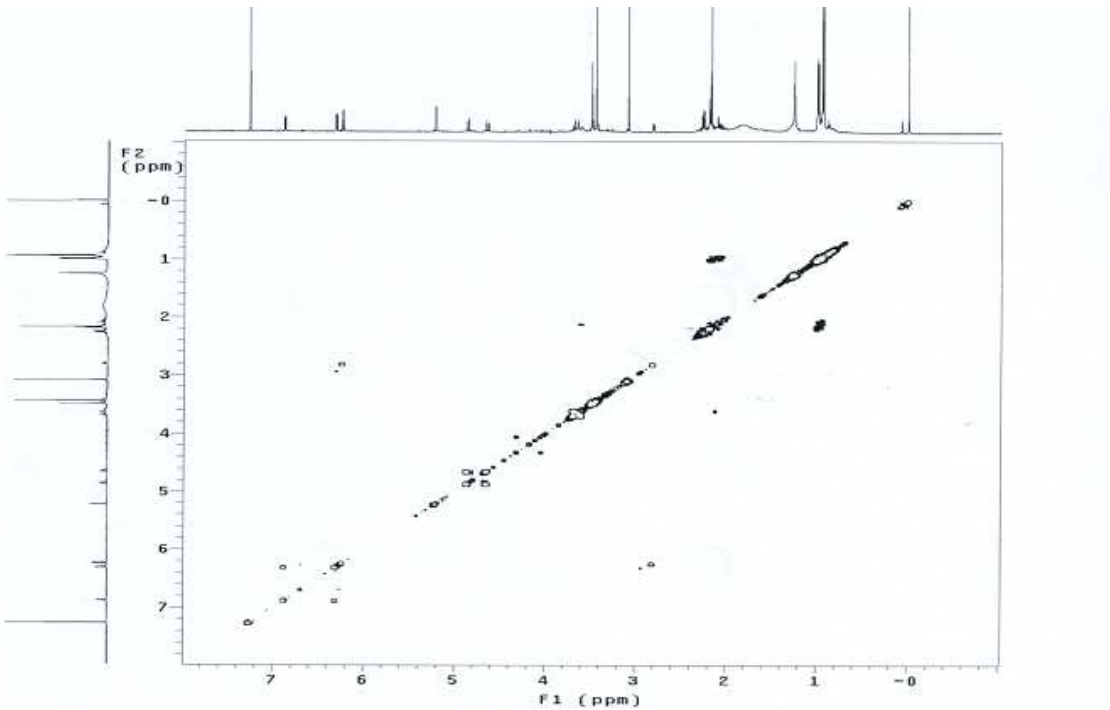


Fig. 5. H-H COSY spectrum data compound 1

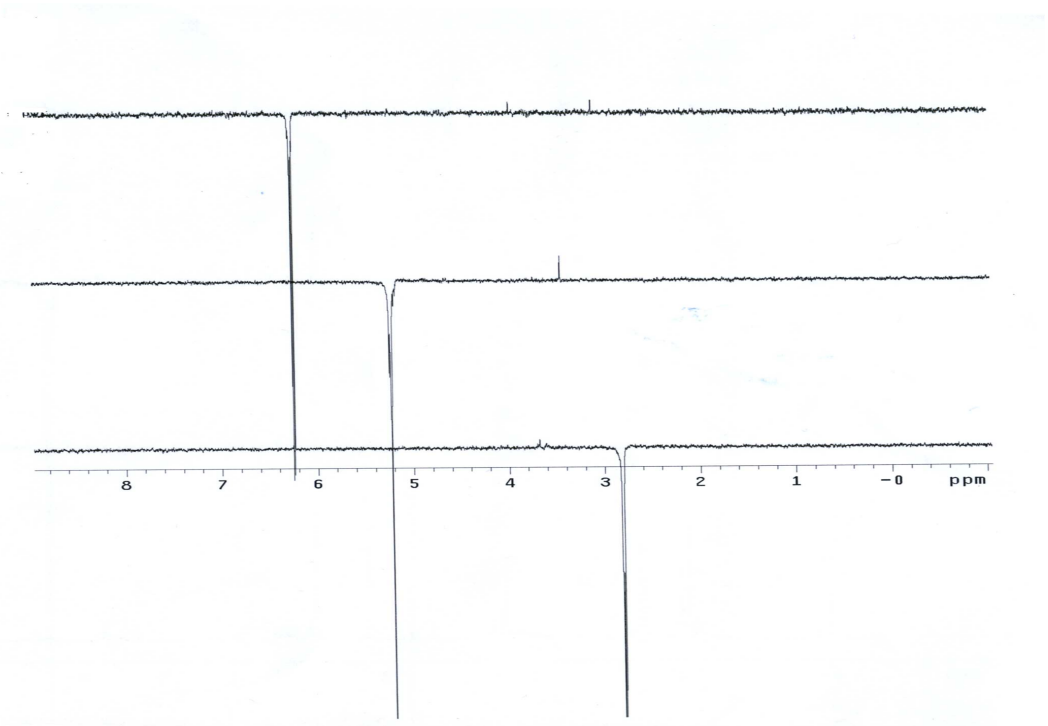


Fig. 6. NOESY spectrum data of compound 1

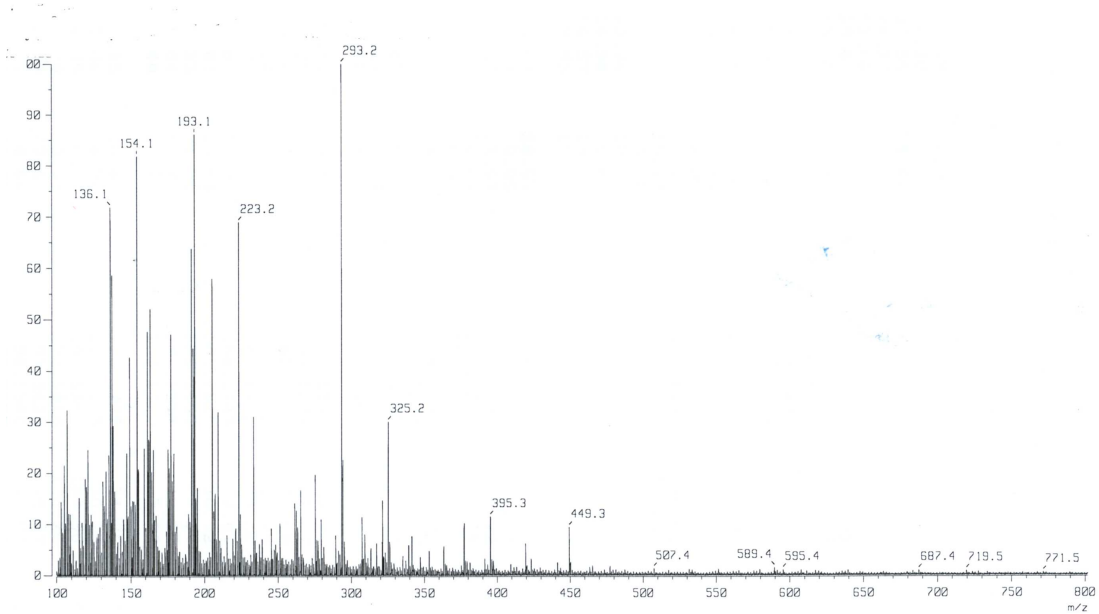


Fig. 7. HR-FAB-Mass spectrum data compound 1

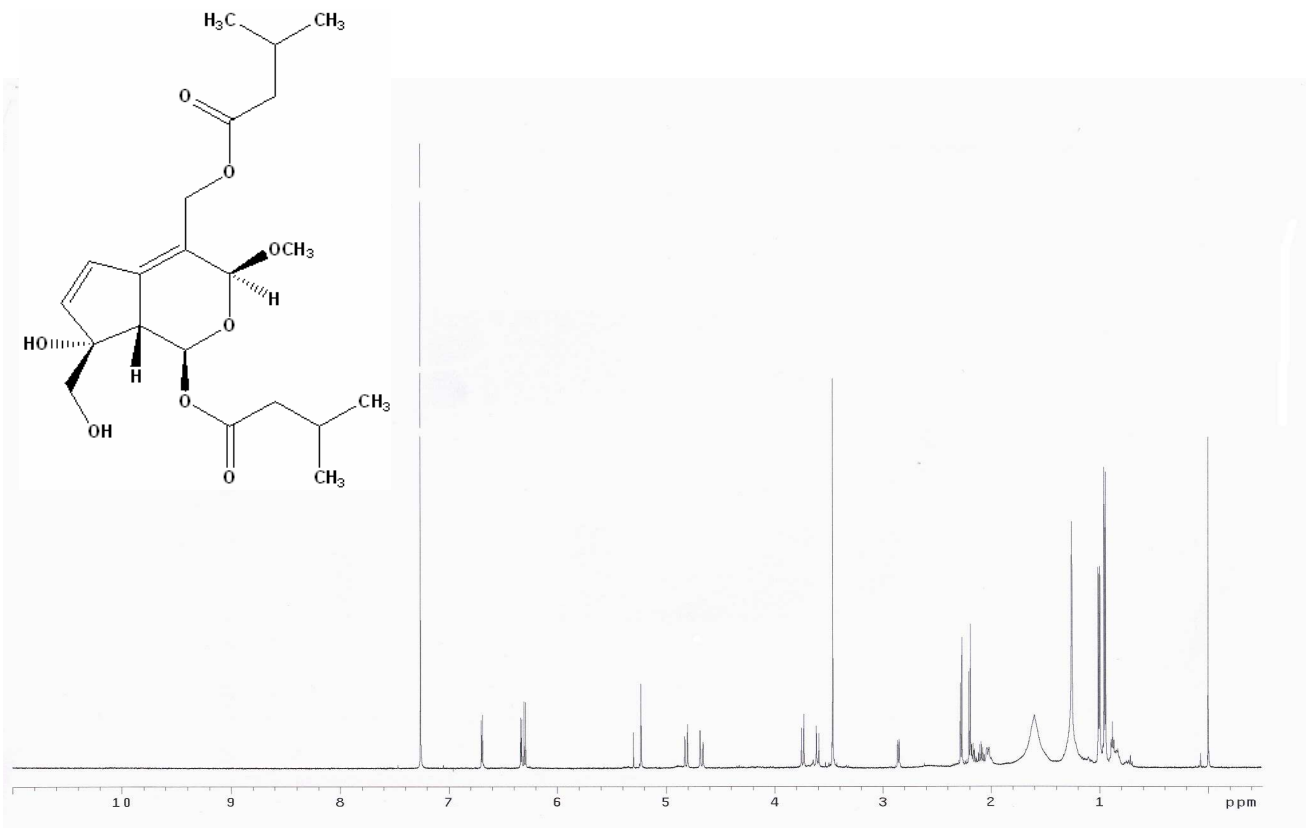


Fig. 8. ^{1}H-NMR spectrum of compound 2 (500MHz, $CDCl_3$)

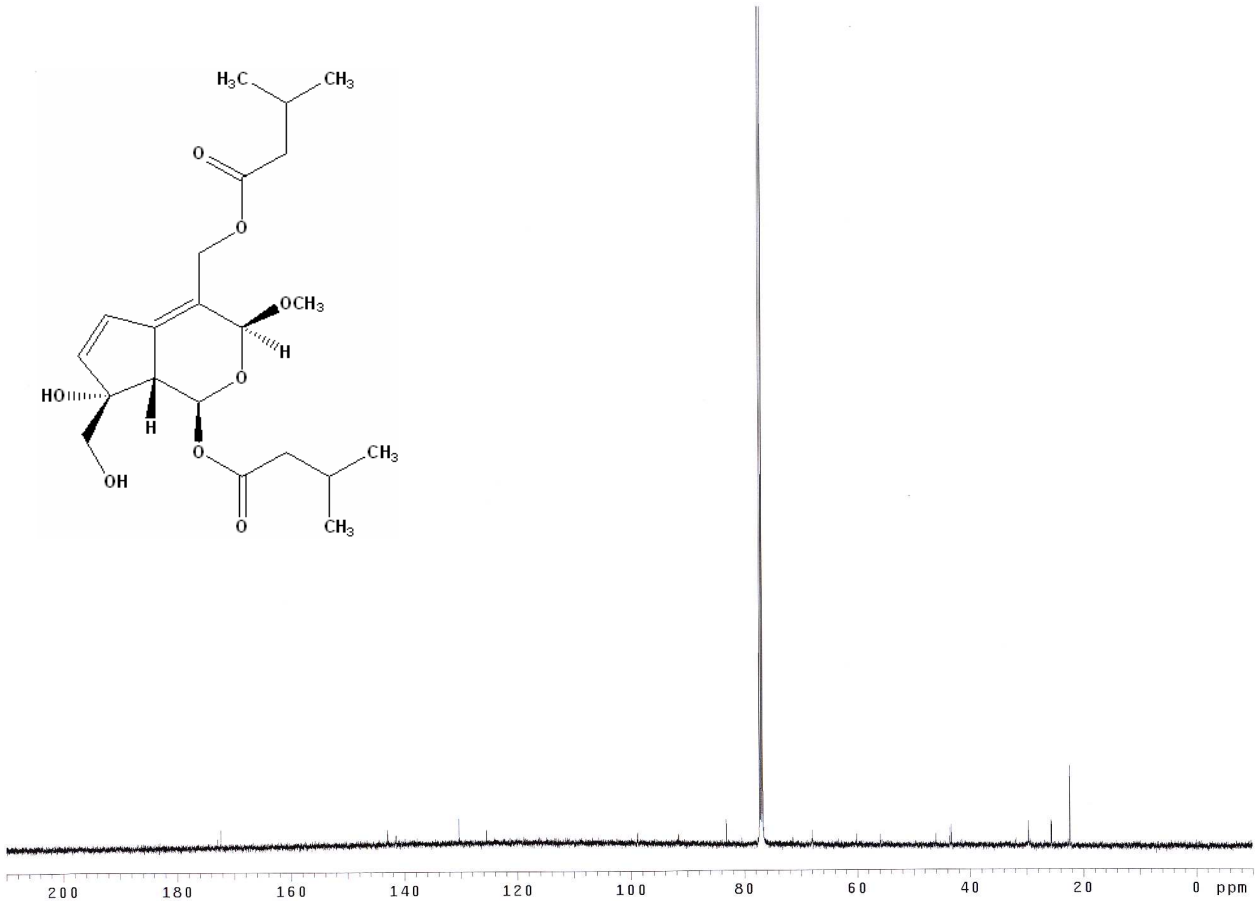


Fig. 9. ^{13}C-NMR spectrum of compound 2 (125MHz, $CDCl_3$)

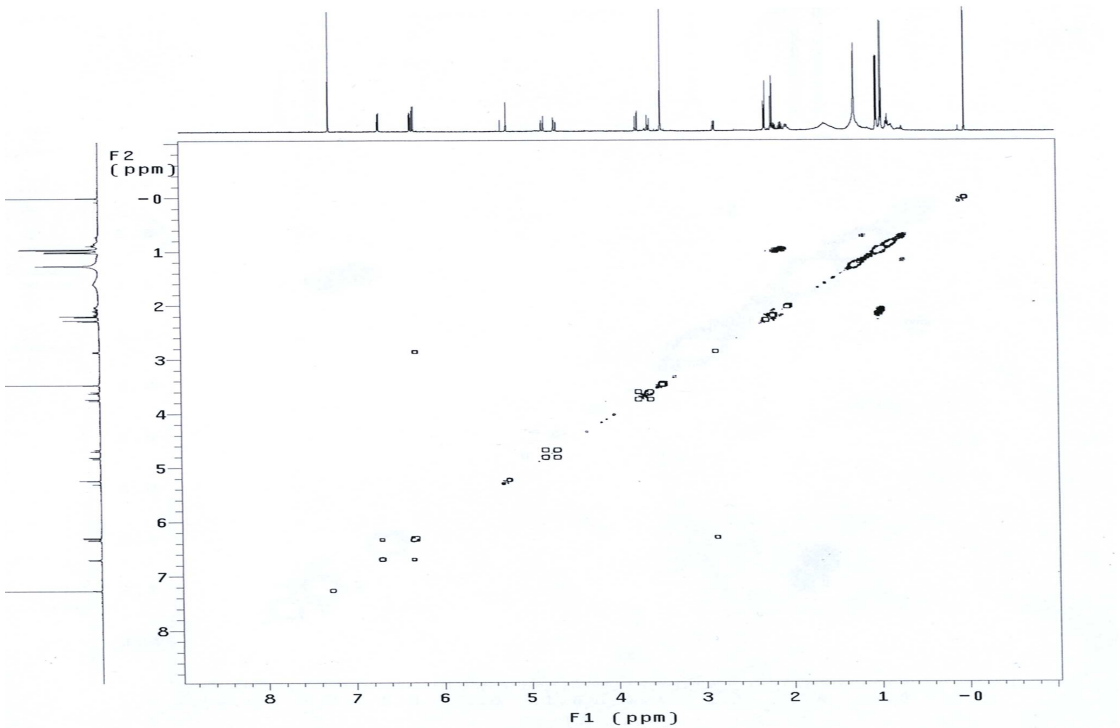


Fig. 10. H-H COSY spectrum data compound 2

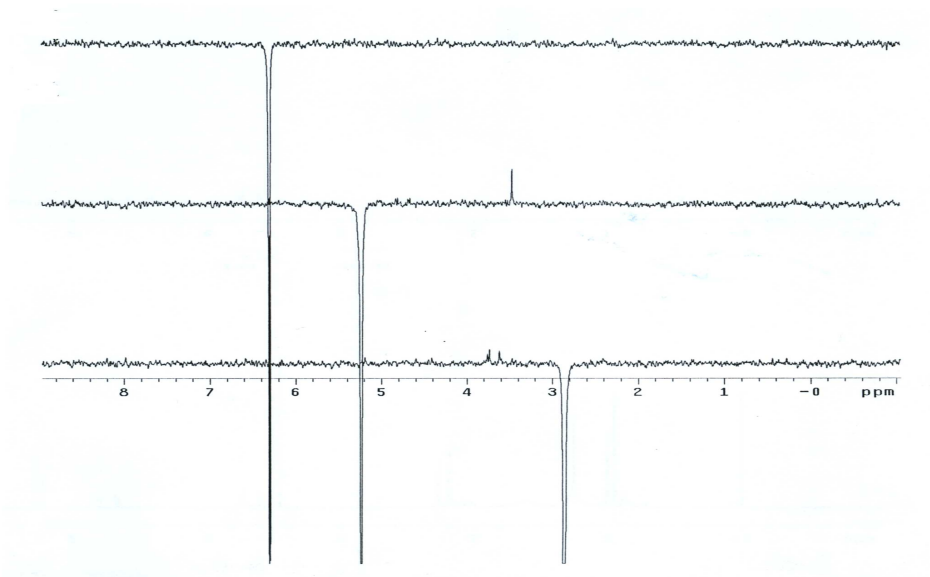


Fig. 11. NOESY spectrum data of compound 2

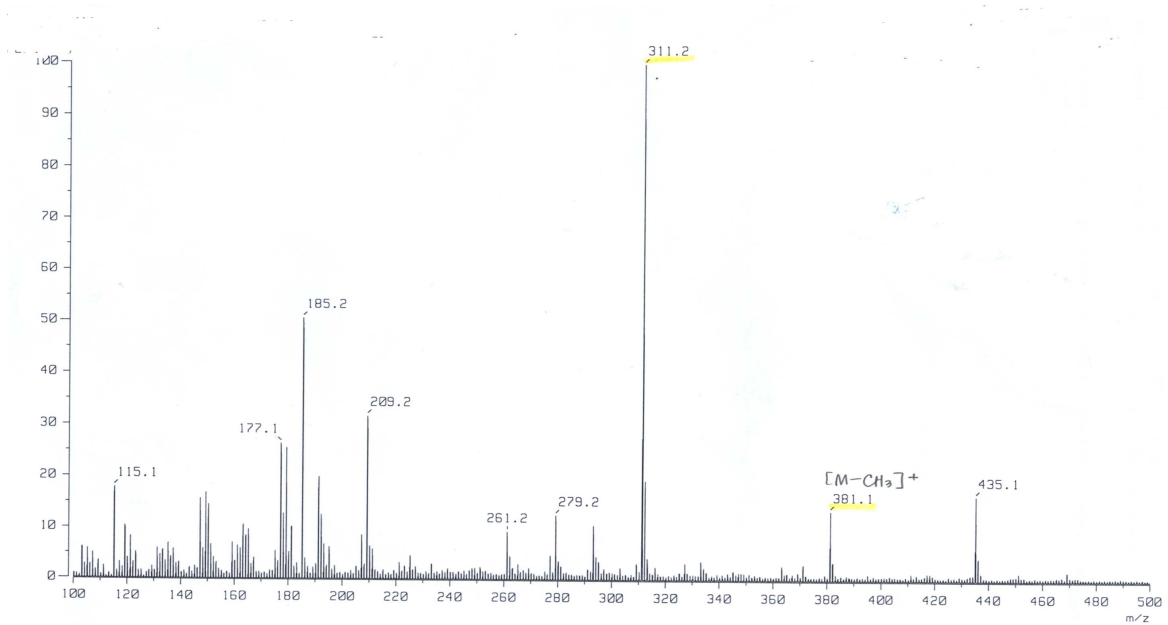


Fig. 12. HR-FAB-Mass spectrum data compound 2

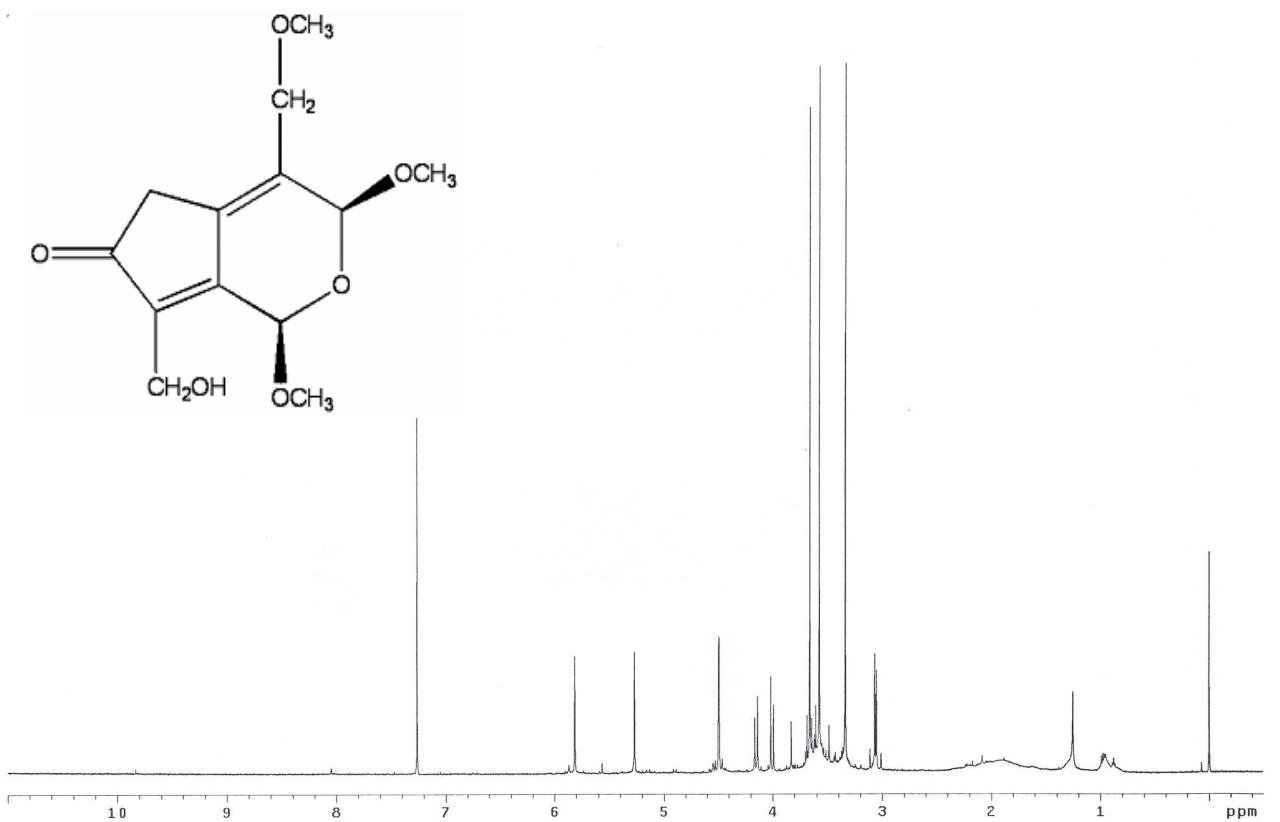


Fig. 13. ^{1}H-NMR spectrum of compound 3 (500MHz, $CDCl_3$)

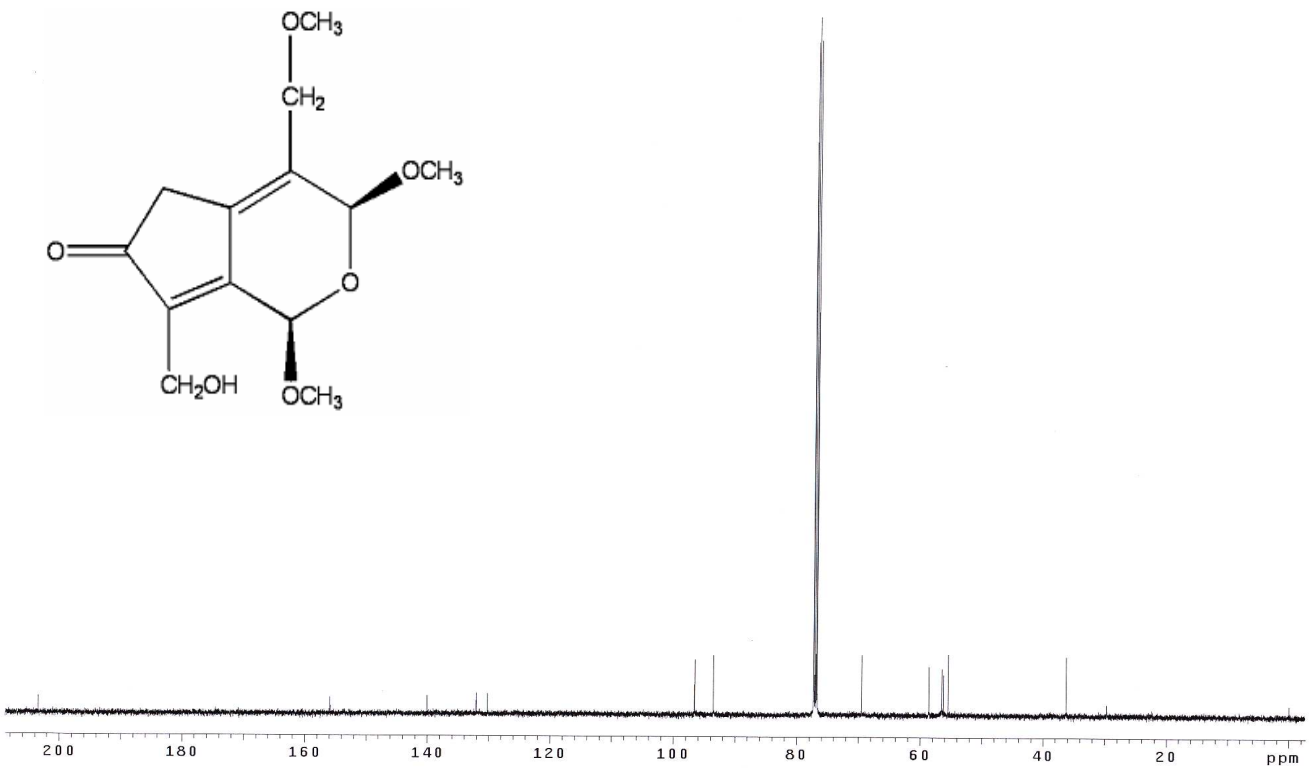


Fig. 14. ^{13}C-NMR spectrum of compound 3 (125MHz, $CDCl_3$)

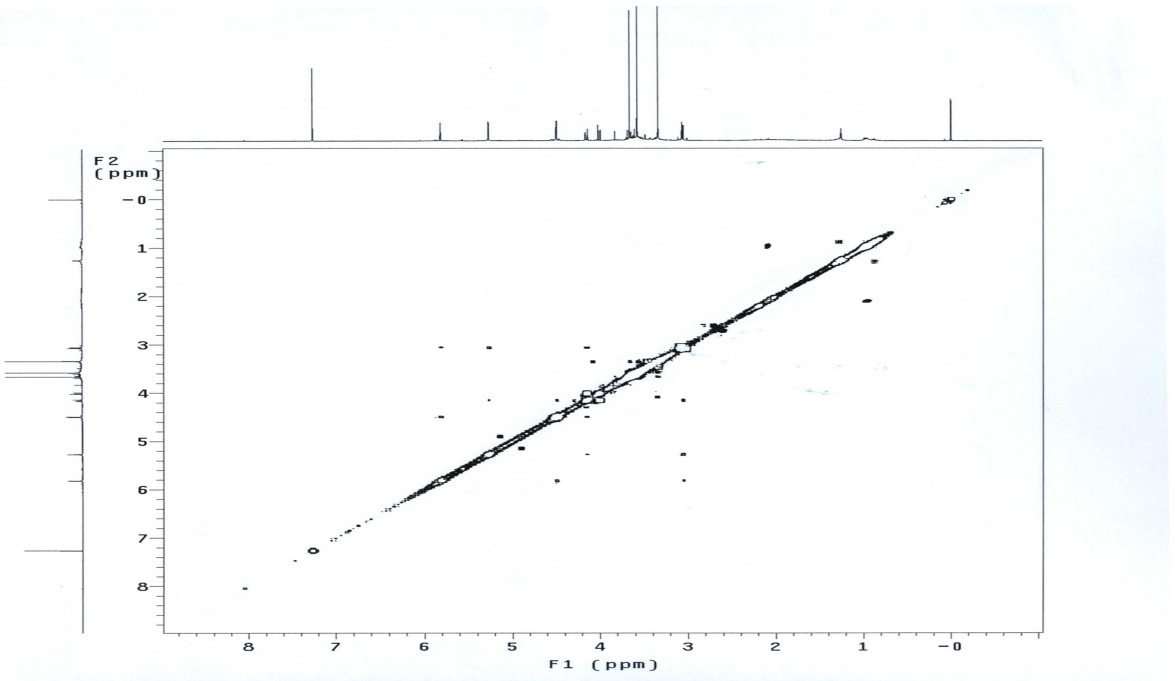


Fig. 15. H-H COSY spectrum data compound 3

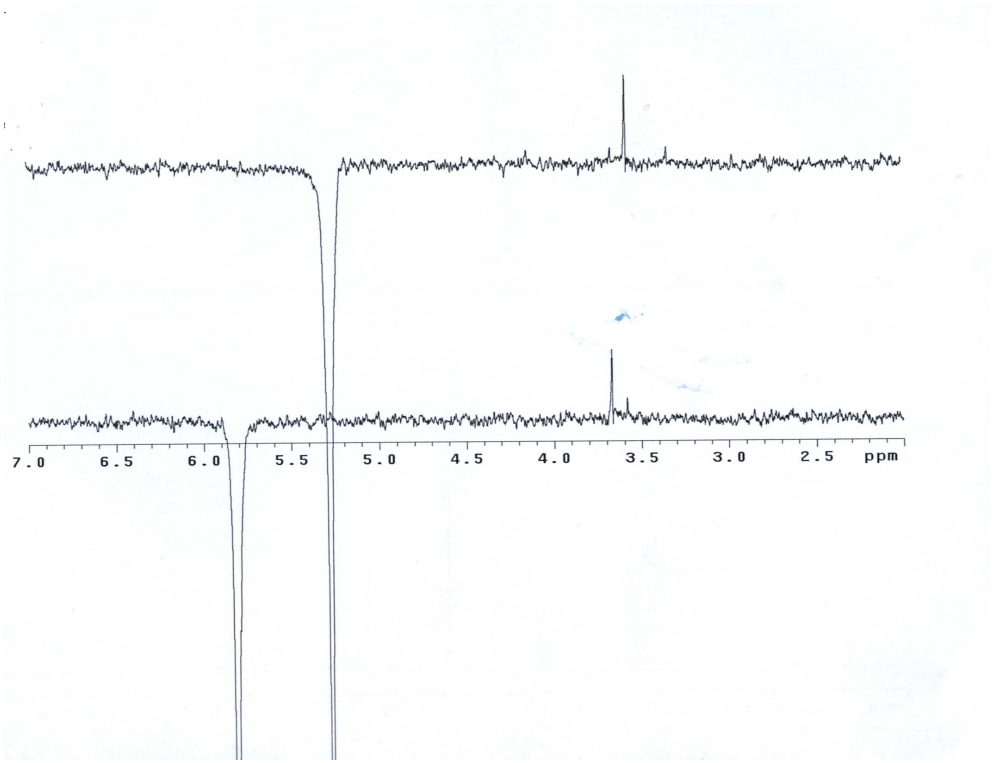


Fig. 16. NOESY spectrum data of compound 3

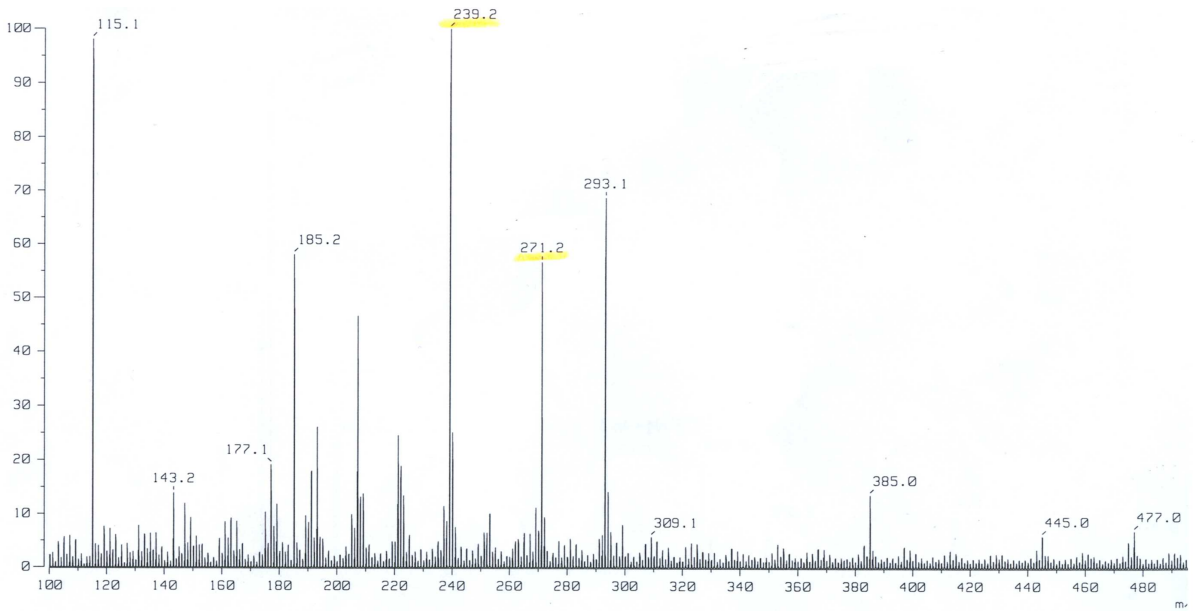


Fig. 17. HR-FAB-Mass spectrum data compound 3

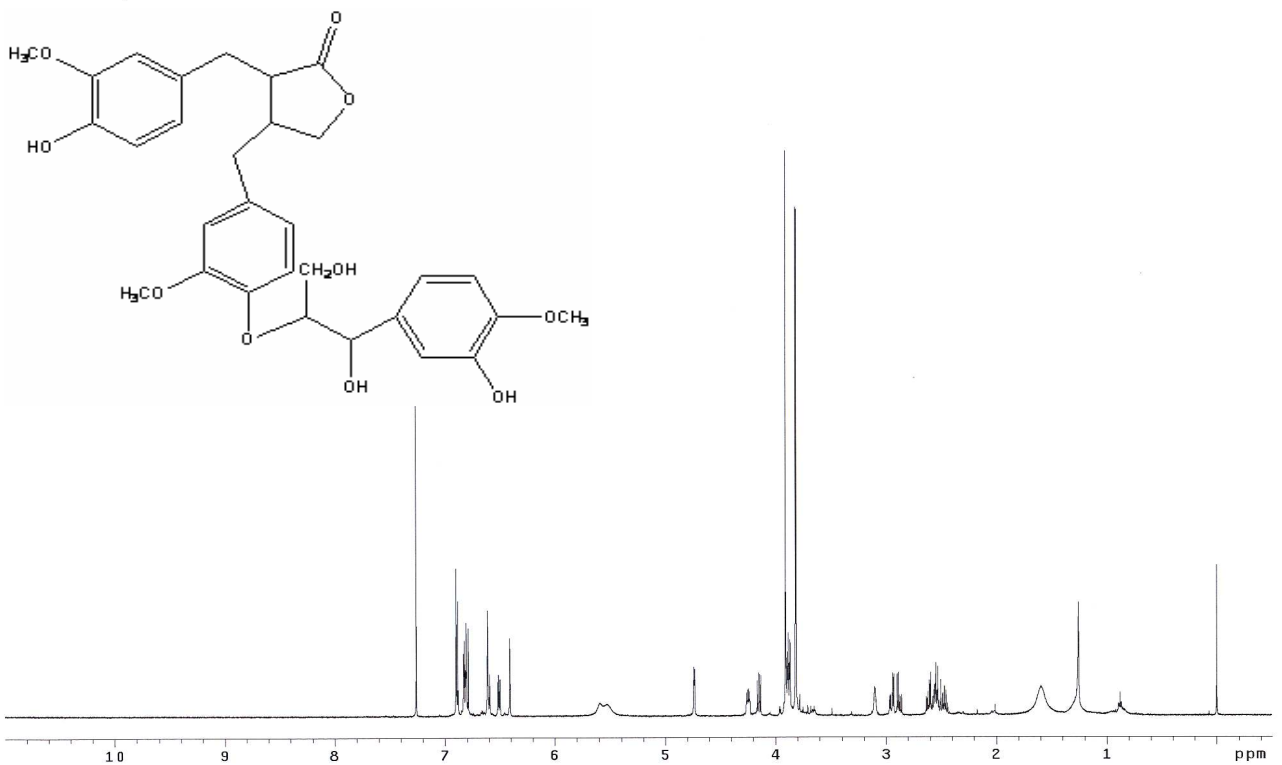


Fig. 18. ^{1} H-NMR spectrum of compound 4 (500MHz, $CDCl_3$)

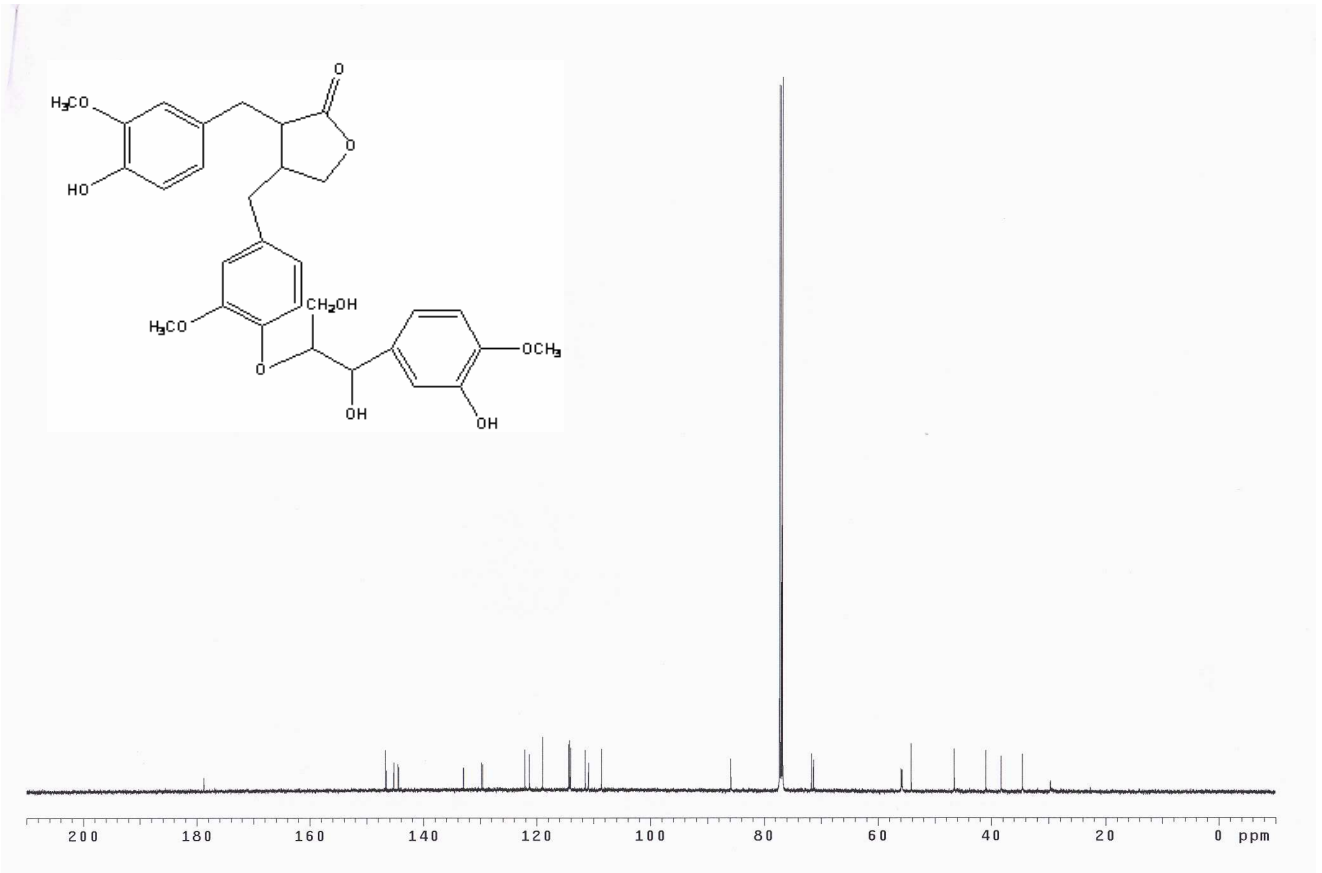


Fig. 19. ^{13}C-NMR spectrum of compound 4 (125MHz, $CDCl_3$)

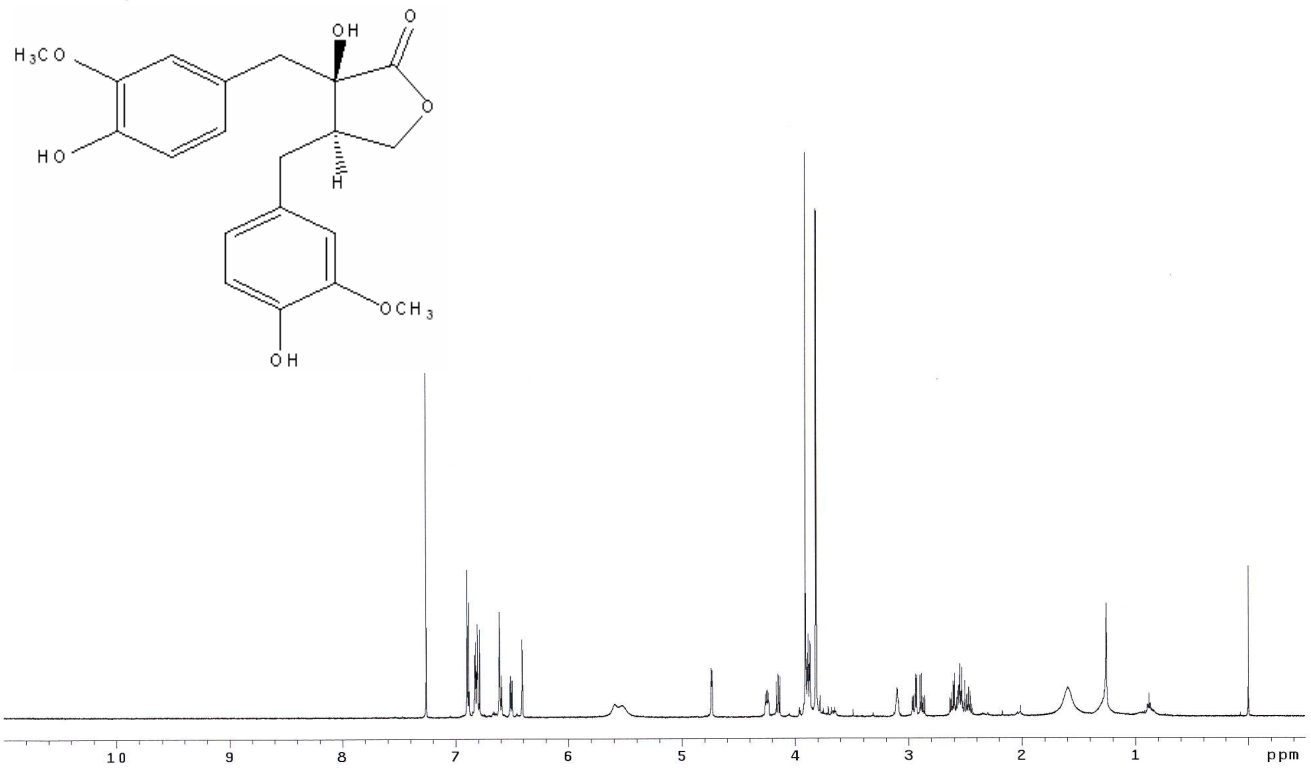


Fig. 20. ^{1}H-NMR spectrum of compound 5 (500MHz, $CDCl_3$)

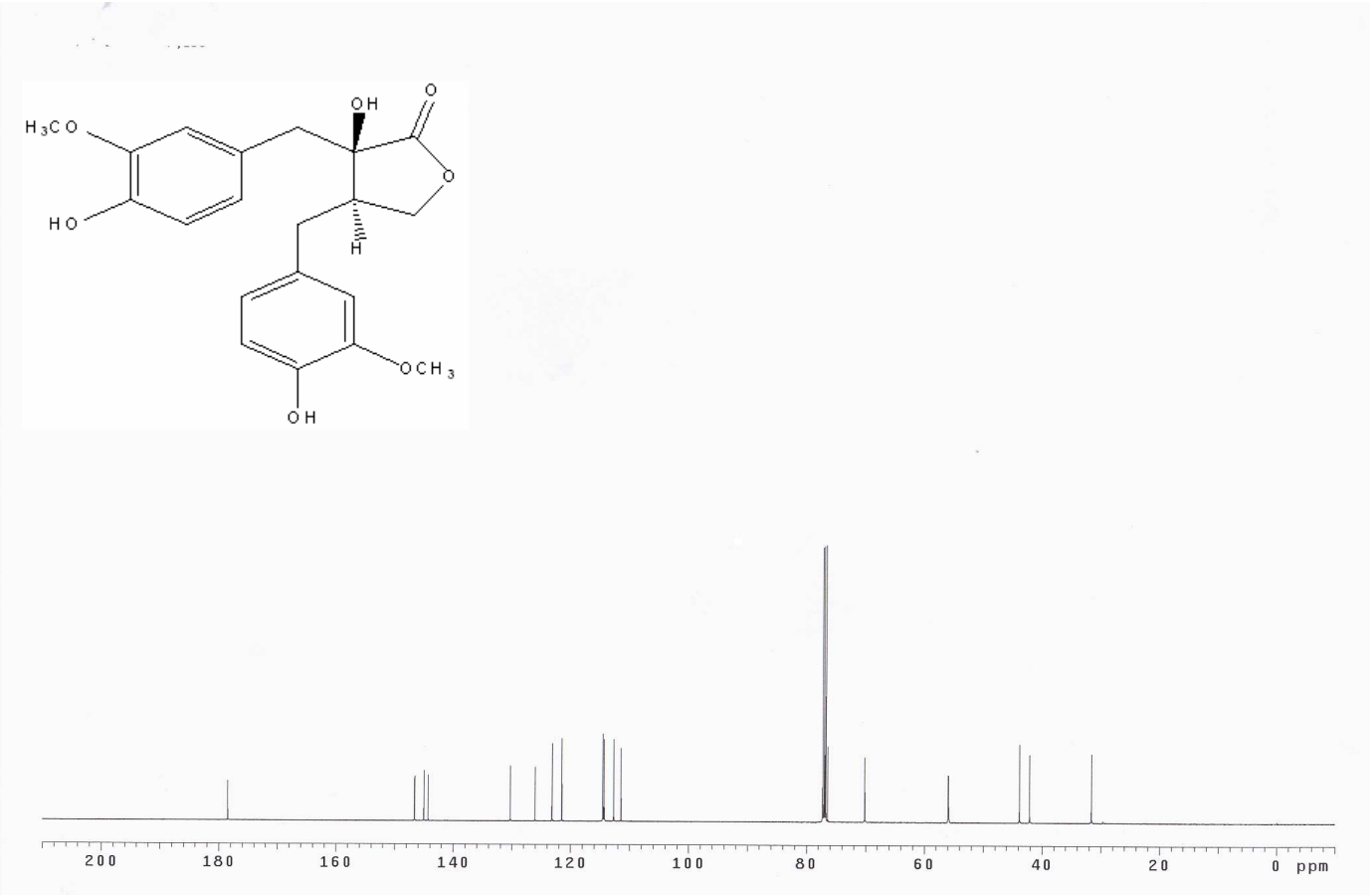


Fig. 21. ^{13}C-NMR spectrum of compound 5 (125MHz, $CDCl_3$)

감사의 글

앞만 보며 달려온 석사 2년 째 드디어 실험의 결실을 맺으며 졸업 논문을 쓰게 되었습니다. 제가 이 자리에 설 수 있게 많은 충고와 격려의 말씀을 전해주신 지도 교수님께 감사의 말씀을 전합니다. 교수님의 사랑의 매가 있었기에 지금의 제가 이렇게 논문을 쓸 수 있었습니다. 다시 한 번 감사의 뜻을 전합니다. 실험실 생활을 하면서 빠질 수 없는 우리 실험실 식구들 김미란 박사님 덕분에 실험의 생활에 있어 필요한 공동체 의식을 배우게 되고, 실험의 기초는 물론 저의 카운슬러가 되 주셨던 박사님, 지금은 실험을 떠나 다른 곳에 있는 은경이 항상 나와 같이 매점 친구가 되어 주고 술친구 해주던 은경이 비록 다른 곳에서 실험은 하고 있지만 항상 날 잊지 않고 전화해주고 격려 해주는 은경이에게도 고마운 마음을 전합니다. 지은선생님 역시 다른 곳으로 가셨지만 항상 옆에서 격려의 말씀 잊지 않고 있습니다.
그리고 경학이 오빠 실험실 처음 들어 왔을 때부터 실험 가르쳐 주고 데이터 분석하는 법도 가르쳐 준 경학이 오빠 고생한 많이 했어요. 고마워요. 그리고 실험실 같이 들어와 먼저 학위하고 나간 현택이 오빠 같이 술친구도 해주고 실험 잘 하라고 말해 주던 현택이 오빠에게도 고마운 마음을 전 합니다.
은희 언니 비록 다른 실험실이지만 실험 할 때 마다 나에게 조언 아끼지 않고 충고 해 주 언니, 항상 많이 부족 한 날 보듬어주고, 때론 충고 해주는 은희 언니 고맙습니다. 그리고 나의 후배이자 친구인 세은이 항상 고맙다는 생각은 하지만 말로 전하지는 못 했어 고마워 선배이지만 날 항상 친구처럼 챙겨 주고 아껴준 정말 착한 후배 세은이 졸업 축하 하고 박사과정도 넌 잘해내리라 믿는다. 생약실의 이쁜 주현 선생님 우리서로 알고 지낸지는 얼마 안 되었지 만 항상 동생처럼 아껴 줘서 고마워요. 나에게 없어서는 않 될 친구들 미진이, 미화, 선애, 송이, 효경이 나의 곁에서 항상 날 응원해 주고 때론 영양보충 시켜준 거 고마운 마음 항상 간직하고 있어. 그리고 임신 중에도 무거운 배를 이끌고 힘 들 때마다 격려 하러 와준 미진이 에게 정말 고마운 마음을 전합니다. 힘 들 때마다 기댈 수 있는 친구가 있다는 게 얼마나 고마운 일인지 알게 해준 미화에게도 고마운 마음을 전합니다. 미진, 미화, 선애, 송이, 효경 그리고 나 우리 6명 모두 서로의 고민을 들어 주고 부족한 부분을 채워주는 친구로 영원히 함께 했으면 좋겠어. 마지막으로 세상에 하나뿐인 우리 가족, 엄마, 아빠, 선철이 에게 감사의 마음을 전 합니다. 우리 남매 모두 대학까지 보내기 위해 고생 많이 하신 아빠, 엄마 그리고 부족 한

것 없이 지금까지 편하게 공부 할 수 있게 해주 부모님께 정말 감사의 마음 전 합니다. 언제나 감사한 마음은 있지만 단 한 번도 표현 못 했습니다. 엄마, 아빠 사랑합니다. 그리고 지금 열심히 공부 하고 있는 선철이 이제는 좋은 결과 있길 바란다.

2007년 12월 석사 학위를 마치며.....
최은진 올림

저작물 이용 허락서

학 과	생물신소재	학 번	20067202	과 정	석사
성 명	한글 : 최은진 한문 : 崔 銀 珍 영문 : CHOI EUN JIN				
주 소	전라남도 담양군 무정면 오룡리 2구 445번지				
연락처	016-624-2690 E-MAIL : cej30740@yahoo.co.kr				
논문제목	한글 : 마타리(***Patrinia scabiasaefolia*** F.)의 새로운 Iridoid계 화합물의 분리 및 규조규명 영문 : Isolation and structure determination of new iridoids from ***Patrinia scabiosaefolia*** F.				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 조건부 동의( ) 반대( )

2007년 11 월 16 일

저작자: 최은진 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하